



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

HANNA RAUHALA
FLUORESENSSIPERUSTEINEN EMULSIOIDEN VISKOSITEETIN
MÄÄRITTÄMINEN

Diplomityö

Tarkastajat: akatemiatutkija Timo
Laaksonen ja yliopistonlehtori
Elina Vuorimaa-Laukkanen
Tarkastajat ja aihe hyväksytty
27. syyskuuta 2017

TIIVISTELMÄ

HANNA RAUHALA: Fluoresenssiperusteinen emulsioiden viskositeetin määrittäminen

Tampereen teknillinen yliopisto

Diplomityö, 47 sivua

Tammikuu 2018

Teknis-luonnontieteellinen koulutusohjelma

Pääaine: Kemia

Tarkastajat: akatemiautkija Timo Laaksonen ja yliopistonlehtori Elina Vuorimaa-Laukkanen

Avainsanat: fluoresenssi, elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskooppi, viskositeetti, emulsio, nanokuituinen selluloosa

Viskositeetin määrittäminen heterogeenisille systeemeille perinteisillä mekaanisilla mittausmenetelmillä on lähes mahdotonta. Emulsioiden viskositeetin määrittämiseen on kehitetty useita matemaattisia malleja, mutta emulsioita monimutkaisempien heterogeenisten systeemien viskositeetin määrittäminen matemaattisesti on hyvin haastavaa. Perinteisesti homogeenisille systeemeille pyritään määrittämään makroskooppinen viskositeetti, joka kuvaa fluidin kykyä vastustaa virtausta. Heterogeenisille systeemeille on hyödyllisempää määrittää eri alueiden mikroskooppinen viskositeetti, joka aiheutuu partikkelin vuorovaikutuksesta sen ympäristön kanssa mikrometriä alueella. Fluoresoivia molekyyliroottoreita pystytään hyödyntämään systeemien mikroviskositeetin jakauman määrittämisessä, sillä fluoresoivien molekyyliroottoreiden fluoresenssin elin aika riippuu voimakkaasti niiden mikroympäristön viskositeetista. Viskoosimmassa ympäristössä fluoresoivan molekyyliroottorin pyörivän osan liike hidastuu, ja fluoresenssin elin aika pitenee.

Tässä työssä pyrittiin määrittämään heterogeenisten systeemien mikroviskositeetin jakaumaa fluoresenssiin perustuvalla mittausmenetelmällä. Tutkimuksessa käytettiin elin aikaerotteista fluoresenssimikroskooppia määrittämään kahden fluoresoivan molekyyliroottorin BODIPY:n ja DASPMI:n fluoresenssin intensiteetin jakaumaa erilaisissa heterogeenisissä seoksissa. Tavoitteena oli selvittää menetelmän toimivuutta yksinkertaisissa heterogeenisissä systeemeissä, ja luoda pohja jatkossa tehtäville monimutkaisempien heterogeenisten systeemien viskositeettimittauksille.

Tutkittavan näytteen ominaisuuksien havaittiin vaikuttavan suuresti sopivan väriaineen valintaan. BODIPY:n hydrofobisuudesta johtuen BODIPY hakeutui heterogeenisissä systeemeissä poolittomiin alueisiin, jolloin BODIPY:lla pystyttiin määrittämään ainoastaan poolittomien alueiden mikroviskositeettien jakaumaa. DASPMI puolestaan soveltui paremmin poolisten alueiden mikroviskositeettien jakauman määrittämiseen. Rajoitteita menetelmälle aiheutti lisäksi BODIPY:n ja DASPMI:n kalibraatioalueet, sillä alhaisilla viskositeettien arvoilla määritetty mikroviskositeetti ei riipu enää lineaarisesti väriaineiden fluoresenssin elin ajasta. Menetelmällä voidaan saatujen tulosten perusteella määrittää erilaisten heterogeenisten systeemien mikroviskositeettien jakaumaa, kunhan käytetty väriaine valitaan tutkittavan näytteen ominaisuuksien perusteella. Menetelmää on mahdollista soveltaa tulevaisuudessa myös monimutkaisten heterogeenisten systeemien, kuten solujen viskositeetin tutkimiseen.

ABSTRACT

HANNA RAUHALA: Fluorescence based determination of viscosity of emulsions
Tampere University of Technology
Master of Science Thesis, 47 pages
January 2018
Master's Degree Programme in Science and Engineering
Major: Chemistry
Examiners: Associate Professor Timo Laaksonen and University Lecturer Elina Vuorimaa-Laukkanen

Keywords: fluorescence, fluorescence lifetime imaging microscope, viscosity, emulsion, nanofibrillated cellulose

Determining viscosity of heterogeneous systems is almost impossible by using traditional mechanical methods. There are many mathematical models for determining viscosity of emulsions, but for more complex heterogeneous systems, the mathematical determination can be very difficult. Macroscopic viscosity, which describes the fluid's flow resistance, is traditionally measured for homogeneous systems by mechanical measurements. For heterogeneous systems, it is more useful to determine microscopic viscosity, which can be defined as the internal resistance or friction of a small particle caused by the interaction with its environment in micrometer scale. Fluorescent molecular rotors can be used to determine the distribution of microviscosity, since the fluorescence lifetime of fluorescent molecular rotors depends on the viscosity of their microenvironment. The more viscous the environment is, the slower the movement of the rotor part of the molecule is which then increases the fluorescence lifetime.

The aim of this study was to determine microviscosity for heterogeneous systems by a fluorescence based method. The intensity distribution of fluorescence lifetime was measured by using a fluorescence lifetime imaging microscope. Measurements were performed for different heterogeneous systems by using DASPMI and BODIPY molecular rotors. The main goal was to determine whether this method can be applied for simple heterogeneous systems, and to create a base for viscosity measurements of more complex heterogeneous systems.

The sample properties were observed to significantly affect the choice of a suitable dye. Due to BODIPY's hydrophobic properties, BODIPY was attracted mainly to the nonpolar regions of heterogeneous systems. Therefore, it was only possible to determine the distribution of microviscosity for the nonpolar regions of heterogeneous systems using BODIPY as the molecular rotor. DASPMI was more suitable for determining the distribution of microviscosity for more polar regions. With the used method, it is important to take into account the calibration areas of the dyes as, the determined viscosity does not depend linearly on the fluorescence lifetime of the dye with low viscosities. Based on the results, the method can be used to obtain the distribution of microviscosity in different heterogeneous systems as long as the dye is chosen properly based on the properties of the sample. In the future, this method can be applied to determine microviscosity in even more complex heterogeneous systems, such as cells.

ALKUSANAT

Tämä diplomityö on tehty Tampereen teknillisen yliopiston kemian ja biotekniikan laboriolle vuoden 2017 aikana. Haluan kiittää työni ohjaajia akatemiatutkija Timo Laaksoista ja yliopistolehtori Elina Vuorimaa-Laukkasta erinomaisesta ohjauksesta ja hyödyllisistä neuvoista työni aikana. Kiitos, että löysitte aina aikaa kysymyksilleni kiireisestä aikataulustanne huolimatta.

Lisäksi haluan kiittää Teekkarikuoroa, joka on tehnyt opiskeluajastani Tampereella erityisen antoisan, ja tuonut tarvittavaa vastapainoa opiskeluun. Kiitos myös kaikille ystäville, joiden kanssa olen saanut jakaa opiskeluideni parhaimmat ja myös turhauttavimmat hetkeni.

Erityinen kiitos kuuluu vanhemmilleni Sirkalle ja Jukalle sekä siskolleni Astalle, jotka ovat aina lannistumatta tukeneet ja uskoneet minuun elämäni kaikilla osa-alueilla. Suurimman kiitoksen haluan osoittaa Rikulle, joka on jaksanut kärsivällisesti auttaa minua vaikeinakin hetkinä ja kannustanut minua yltämään parhaimpaani.

Tampereella, 15.12.2017

Hanna Rauhala

SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO	1
2.	FLUORESENSSI.....	2
2.1	Jablonskin diagrammi	2
2.2	Fluoresenssin elinaika ja kvanttisuhde.....	4
2.3	Mikroympäristön vaikutus fluoresenssiin	5
2.4	Fluoroforit	7
3.	FLUORESENSSIMIKROSKOPIA	11
3.1	Elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskooppi	11
3.2	Viskositeetin tutkiminen fluoresenssin avulla.....	11
4.	HETEROGEENISET SYSTEEMIT	14
4.1	Emulsiot	14
4.2	Nanoselluloosa	17
4.2.1	Selluloosan rakenne	17
4.2.2	Nanokuituinen selluloosa.....	19
5.	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	21
5.1	Laitteisto.....	21
5.2	FLIM-kuvien analysointi.....	23
5.3	Fluoroforit	23
5.4	Näytteet	24
5.5	Kalibraatio.....	24
6.	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU.....	26
6.1	Puhtaat liuottimet	26
6.2	Emulsiot	29
6.3	Nanokuituinen selluloosa	35
7.	JOHTOPÄÄTÖKSET.....	40
	LÄHTEET.....	43

LYHENTEET JA MERKINNÄT

a.u.	engl. arbitrary unit, mielivaltainen yksikkö
BNC	engl. bacterial nanocellulose, bakteerien tuottama nanoselluloosa
DMF	dimetyyliformamidi
DMSO	dimetyylisulfoksidi
FCU	engl. fiber coupling unit, laserdiodien kytkentäyksikkö
FLIM	engl. fluorescence lifetime imaging microscopy, elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskopia
IC	engl. internal conversion, sisäsiirtymä
ISC	engl. intersystem crossing, systeemien välinen siirtymä
ka.	keskiarvo
MOU	engl. main optical unit, elinaikaerotteisen fluoresenssimikroskoopin optinen pääyksikkö
N.A.	engl. numerical aperture, numeerinen aukko
NCC	engl. nanocrystalline cellulose, nanokiteinen selluloosa
NFC	engl. nanofibrillated cellulose, nanokuituinen selluloosa
O/W	engl. oil in water, emulsio, öljyä vedessä
O/W/O	engl. oil in water in oil, öljyä vesi-öljy emulsiassa
PD	engl. photodiode, valodiodi
S	singlettitila
SDS	engl. sodium dodecyl sulphate, natriumlauryylisulfaatti
SPAD	engl. single-photon avalanche diode, yksittäisfotonivyörydiodi
T	triplettitila
TCSPC	engl. time-correlated single photon counting, aikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta
TTTR	engl. time-tagged time-resolved, aikamerkitty aikaerotteinen mitausmenetelmä
VR	engl. vibrational relaxation, vibraatiorelaksaatio
W/O	engl. water in oil, emulsio, vettä öljyssä
W/O/W	engl. water in oil in water, vettä öljy-vesi emulsiassa
<i>a</i>	fluoresenssin elinajan amplitudi
<i>c</i>	valonnopeus ($2,998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$)
<i>E</i>	energia (J)
<i>h</i>	Planckin vakio ($6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$)
<i>I</i>	intensiteetti (W m^{-2})
<i>k</i>	nopeusvakio
<i>N</i>	lukumäärä
<i>p</i>	sovitettujen parametrien lukumäärä
<i>R</i>	havaittu fluoresenssi
<i>R_c</i>	laskennallinen fluoresenssi
μ	viskositeetti (Pa·s)
λ	aallonpituus (m)
Φ	fluoresenssin kvanttisuhde
τ	fluoresenssin elinaika (s)
x^2	sovituksen virhe

1. JOHDANTO

Makroskooppinen viskositeetti kuvaa fluidin kykyä vastustaa virtausta. Mikroskooppinen viskositeetti aiheutuu taas partikkelin vuorovaikutuksesta sen ympäristön kanssa mikrometrien alueella. Homogeenisille näytteille makroskooppinen viskositeetti määritetään tavallisimmin mekaanisilla tutkimusmenetelmillä, jotka vaativat paljon tutkittavaa näytettä. Heterogeenisille näytteille tällaiset menetelmät eivät sovellu, vaan heterogeenisissä systeemeissä tulee tarkastella mikroviskositeetin jakaumaa näytteessä. Emulsioiden viskositeetin määrittämiseen on olemassa useita matemaattisia malleja, jotka määrittävät viskositeetin joko dispergoituneen faasin tilavuuden suhteen, tai dispergoituneen ja jatkuvan faasin viskositeettien avulla (Farah et al. 2005). Mallit eivät kuitenkaan ota huomioon lämpötilan vaikutusta viskositeettiin. Emulsioita monimutkaisempien heterogeenisten systeemien viskositeettien määrittäminen matemaattisesti on hyvin haastavaa. Fluoresoivia molekyyliroottoreita hyödyntävää fluoresenssiin perustuvaa menetelmää voidaan käyttää määrittämään mikroviskositeetin jakaumaa erilaisissa systeemeissä. Menetelmän etuna on, ettei siinä tarvita paljoa tutkittavaa näytettä, ja sen on havaittu toimivan hyvin erilaisten heterogeenisten systeemien mikroviskositeetin määrittämiseen aikaisemmissa tutkimuksissa (Shimolina et al. 2017, Gupta et al. 2016, Hosny et al. 2013, Kuimova 2012).

Tutkimuksen tavoitteena oli määrittää heterogeenisten seosten, kuten emulsioiden mikroviskositeettia käyttämällä erilaisia fluoresoivia molekyyliroottoreita, joiden fluoresenssin elinaika riippuu voimakkaasti niiden ympäristön viskositeetista. Tutkimuksessa käytettiin elinaikaeroista fluoresenssimikroskopiaa, jolla voidaan havainnollistaa heterogeenisten systeemien mikroviskositeetin jakaumaa. Tutkimuksessa käytetyt fluoresoivat molekyyliroottorit olivat hydrofobinen BODIPY (4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indatseeni) ja hydrofiilisempi DASPMI (4-(4-(dimetyyliamino)styryyli)-N-metyyli-pyridiniumjodidi). Tavoitteena oli luoda pohja jatkossa tehtäville monimutkaisempien heterogeenisten systeemien viskositeettimittauksille, jotta käytetty menetelmä saadaan optimoitua tarkoitukseen sopivaksi esimerkiksi solujen viskositeetin määrittämistä varten.

Työn teoriaosassa käsitellään aluksi fluoresenssin teoria, sillä käytetty menetelmä perustuu pohjimmiltaan fluoresenssiin. Tämän jälkeen teoriaosassa käydään läpi tutkittujen heterogeenisten systeemien, eli emulsioiden ja nanoselluloosan, ominaisuuksia. Kokeellinen osa aloitettiin tutkimalla mikroviskositeettia homogeenisissa liuottimissa, joiden makroviskositeettien arvot tunnettiin. Tämän jälkeen kokeellisessa osassa edettiin heterogeenisten systeemien mikroviskositeettien määrittämiseen.

2. FLUORESENSSI

Luminesenssi on valon emissiota elektronisesti virittyneestä aineesta. Fluoresenssi ja fosforesenssi ovat luminesenssia, jossa viritystila muodostuu aineen absorboidessa valoa. Virittynyt tila purkautuu muun muassa aineesta emittoituneena valona. Viritystila A^* muodostuu, kun fluoresoivan molekyylin eli fluoroforin elektroni siirtyy perustilalta korkeammalle energiatilalle. (Valeur 2001, s. 3-4). Fluoroforin absorboima energia on kääntäen verrannollinen fotonin aallonpituuteen

$$E = h \frac{c}{\lambda}, \quad (2.1)$$

jossa h on Planckin vakio, ja c ja λ ovat valonnopeus ja aallonpituus tyhjiössä (Lichtman et al. 2005).

Fluorofori voi palata perustilalleen A emittoimalla fotonin $h\nu$



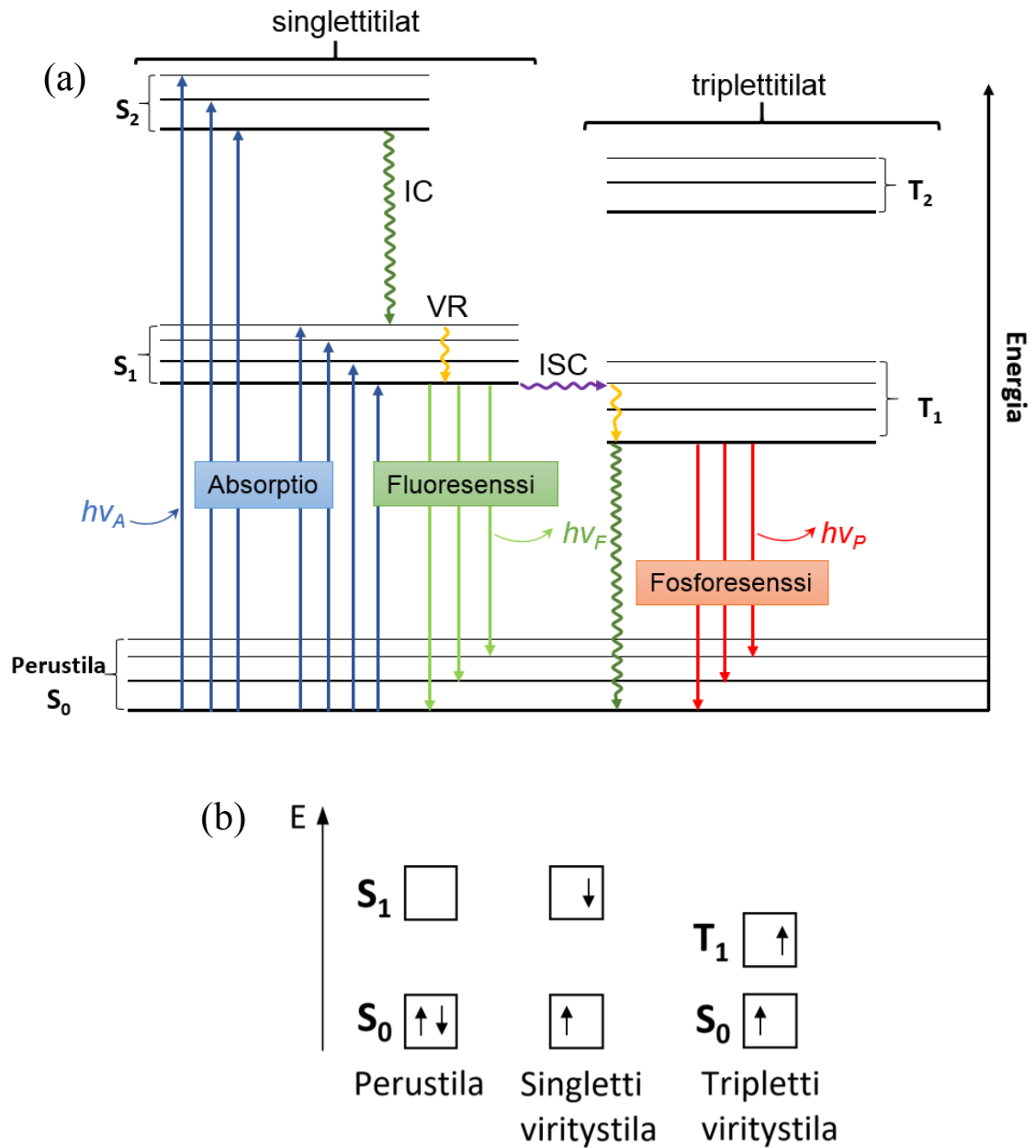
tai ilman vapautuvaa säteilyä esimerkiksi muuttamalla virittyneen tilan energian lämpöenergiaksi (Suhling et al. 2015)



Molekyylillä on myös muita mahdollisia tapoja perustilalle palautumiseen ilman vapautuvaa säteilyä, esimerkiksi fluoroforin molekyylin rotaation kautta (Kuimova 2012).

2.1 Jablonskin diagrammi

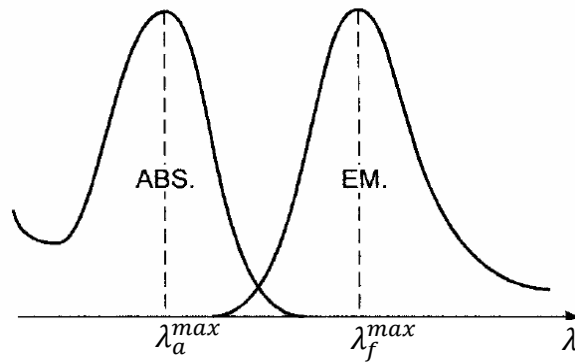
Absorptiossa ja emissiossa tapahtuvia prosesseja kuvataan usein Jablonskin diagrammilla (Kuva 2.1.). Singlettitilat (S_0, S_1, S_2, \dots) kuvataan diagrammin vasemmalle laidalle. Ne ovat tiloja, joissa elektronit ovat pariutuneet, eli niillä on vastakkaiset spintorientaatiot ($+\frac{1}{2}$ ja $-\frac{1}{2}$). S_0 kuvaa aineen perustilaa ennen viritystä. Diagrammin oikeassa laidassa ovat triplettitilat (T_1, T_2, \dots). Triplettitilassa elektroni ei ole ainoastaan siirtynyt korkeammalle energiatasolle, vaan lisäksi sen spinorientaatio on muuttunut vastakkaisuuntaiseksi (Kuva 2.1.).



Kuva 2.1. (a) Yksinkertaistettu Jablonskin diagrammi, jossa $h\nu$ kuvaa absorboituvaa ja emittoituvaa fotonia ja (b) elektronien spinorientaatiot eri viritustiloilla.

Sisäsiirtymä (engl. internal conversion, IC) on säteilemätön siirtymä kahden tilan välillä, joilla on sama spinin multiplisiteetti (Valeur 2001, s. 37). Sisäsiirtymää seuraa usein vibraatiorelaksaatio (engl. vibrational relaxation, VR). Vibraatiorelaksaatiossa fluoroforin värähtelyn energia siirtyy lähellä oleviin molekyyliin suoralla vuorovaikutuksella. Sisäsiirtymässä ja vibraatiorelaksaatiossa ei emittoitu lainkaan fotonia, ja viritustilan purkautuminen kestää vain muutamia pikosekunteja. Tyypillisesti vibraatiorelaksaatio palauttaa molekyylin takaisin S_1 tason alimmalle energiatasolle (Kuva 2.1.). (Lichtman et al. 2005). Systemien välinen siirtymä (engl. intersystem crossing, ISC) on myös säteilemätön siirtymä. ISC tapahtuu kahden tilan välillä, joilla on erisuuriset spinien multiplisiteetit. Siirtymä tilalta S_1 tilalle T_1 (Kuva 2.1.) on esimerkki systemien välisestä siirtymästä.

Ennen fotonin emittoitumista fluoresenssilla, osa viritysenergiasta pääsee yleensä purkautumaan jo sisäsiirtymän ja/tai vibraatiorelaksaation kautta. Tästä johtuen emittoituvan fotonin energia on alhaisempi kuin absorboituvan fotonin energia, ja emissiospektri on siirtynyt korkeammalle aallonpituusalueelle. (Lichtman et al. 2005). Aineen absorboimaa aallonpituusaluetta kutsutaan absorptiospektriiksi ja emittoimaa aallonpituusaluetta emissiospektriiksi (Kuva 2.2.).



Kuva 2.2. Absorptio- ja emissiospektrit, jossa λ_a^{\max} on absorptiospektrin ja λ_f^{\max} emissiospektrin maksimiaallonpituus. (Muokattu lähteestä Valeur 2001, s. 55)

Useimpien fluoroforien emissiospektrit ovat $S_1 \leftarrow S_0$ absorptiospektrien peilikuvia, johdun siitä, että molekyylin atomien paikat eivät juurikaan muutu viritystilän muodostuessa (Lakowicz 2006, s. 5).

2.2 Fluoresenssin elinaika ja kvanttisuhde

Fluoresenssin elinaika τ ja kvanttisuhde Φ ovat fluoroforien tärkeimpiä ominaisuuksia. Fluoresenssin kvanttisuhde kuvaa aineesta emittoituneiden fotonien lukumäärä suhteessa aineeseen absorboituneisiin fotoneihin. Kvanttisuhde saadaan laskettua yhtälöllä

$$\Phi = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S}, \quad (2.4)$$

missä k_r^S on fluoroforin emissionopeusvakio ja k_{nr}^S on säteilemättömien siirtymien nopeusvakioiden summa

$$k_{nr}^S = k_{ic}^S + k_{isc}^S, \quad (2.5)$$

jossa k_{ic}^S on sisäsiirtymän ja k_{isc}^S systeemien välisen siirtymän nopeusvakio (Lakowicz 2006, s. 9, Valeur 2001, s. 42).

Virittyneen tilan elinaika τ määritellään sen mukaan, miten kauan molekyyli keskimäärin pysyy virittyneessä tilassa ennen perustilalle palaamista. Elinaika on viritystilasta poistuvien siirtymien nopeusvakioiden summan käänteisluku (Lakowicz 2006, s. 9)

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}. \quad (2.6)$$

Käytännössä fluoresenssin elinaika voidaan havaita fluoresenssin intensiteetin I vaimenemisena ajan t funktiona. Mikäli fluoresoivalla aineella on N elinajan komponenttia, voidaan fluoresenssin intensiteetti esittää yhtälöllä

$$I(t) = \sum_{i=1}^N a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (2.7)$$

jossa a_i on kunkin elinajan amplitudi.

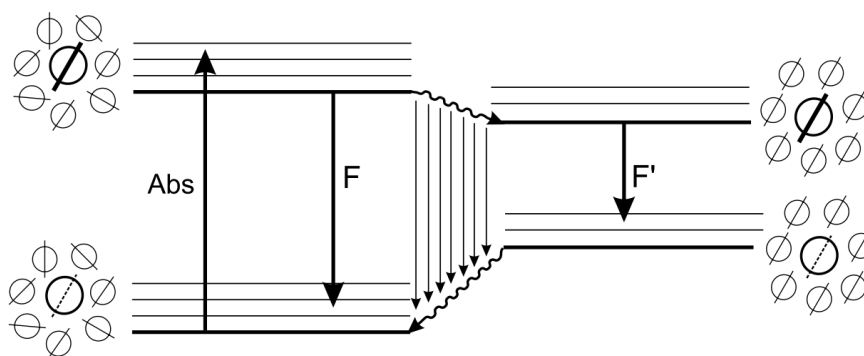
Triplettitilojen elinajat ovat hieman pidempiä kuin singlettitilojen. Tyypillinen S_1 -viritystilan elinaika on $10^{-10} - 10^{-7}$ s, kun taas T_1 -tilan elinaika on yleensä $10^{-6} - 1$ s (Valeur 2001, s. 35). Tästä syystä fluoresenssi havaitaan lähes heti absorption jälkeen, kun taas fosforesenssin havaitsemiseen kuluu pidempi aika.

2.3 Mikroympäristön vaikutus fluoresenssiin

Virittynyt molekyyli voi palata fotonin absorption jälkeen perustilalleen muillakin tavoin, kuin fluoresenssin, sisäsiirtymän tai systeemien välisen siirtymän ja tästä seuraavan fosforesenssin kautta. Myös molekyylin sisäiset varaustensiirrot ja molekyylin konformaation muutokset voivat palauttaa molekyylin takaisin perustilalleen. Lisäksi molekyylien väliset vuorovaikutukset, kuten esimerkiksi elektronin- ja protoninsiirto, energian siirto ja eksimeerin tai eksipleksin muodostuminen, voivat johtaa virityksen purkautumiseen (Valeur 2001, s. 9-10). Vaihtoehtoiset reitit energian purkautumiseen ovat mahdollisia, mikäli ne tapahtuvat keskimäärin samassa aikaskaalassa kuin fluoresenssi.

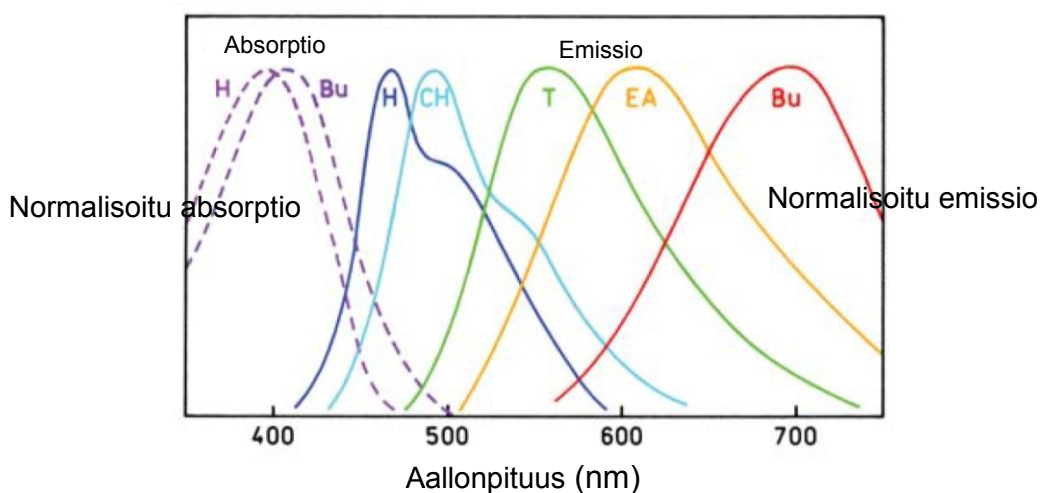
Molekyylin mikroympäristö vaikuttaa fluoresenssin perusominaisuuksiin, kuten spektriin, kvanttisuhteeseen ja elinaikaan. Tätä voidaan käyttää hyväksi tutkittaessa mikroympäristön fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia, kuten poolisuutta, pH:ta, painetta, viskositeettia, lämpötilaa, fluoresenssin sammuttajia ja vetysidoksia (Valeur 2001, s. 10-11). Fluoresenssin herkkyys mikroympäristön ominaisuuksien muutoksille tekee fluoresenssiin perustuvista tekniikoista tärkeän työkalun molekyylien ominaisuuksien tutkimiseen.

Liuoksen poolisuudelle on suuri vaikutus fluoroforin emissioon. Tavallisesti fluorofori virittyy ensimmäiselle singlettitilalle S_1 . Liuoksen pooliset molekyylit laskevat fluoroforin viritystilaa matalaenergisemmäksi järjestäytymällä uudelleen virityksen tapahtuessa (engl. solvent relaxation) (Lakowicz 2006, s. 205-206). Molekyylien uudelleenjärjestäytyminen on esitetty kuvassa 2.3.



Kuva 2.3. Liuotinmolekyylien uudelleenjärjestäytyminen virittyneen fluorofoirin ympärillä ja siitä johtuvan Stokesin siirtymän synty. Vasemmassa laidassa on kuvattu fluorofoirin ja liuoksen molekyyliden järjestäytymistä dipolimomentin suhteen ennen uudelleenjärjestäytymistä ja oikeassa laidassa uudelleenjärjestymisen jälkeen. Molekyylien järjestäytyessä virittyneen tilan energia laskee, ja emissio tapahtuu matalaenergisemmältä tilalta. (Muokattu lähteestä Valeur 2001, s. 206).

Liuoksen poolisuuden kasvaessa, siirtyvät myös fluorofoirin viritystilat matalaenergisemmiksi (Lakowicz 2006, s. 205-206). Fluorofoirin emissio tapahtuu siis matalaenergisemmältä tilalta liuoksen poolisuuden kasvaessa, jolloin myös emissioaallonpituudet kasvavat. Liuoksen poolisuus ei juurikaan vaikuta absorptioaallonpituuteen, sillä absorptio tapahtuu hyvin lyhyessä ajassa (10^{-15} s) (Valeur 2001, s. 206). Kuvassa 2.4. on esitetty dansyylin (DNS) absorptio- ja emissiospektrejä eri liuottimissa. Tavallisesti vain pooliset fluoroforit, reagoivat herkästi liuoksen poolisuuteen. Poolittomat molekyylit ovat vähemmän herkkiä liuoksen poolisuudelle.

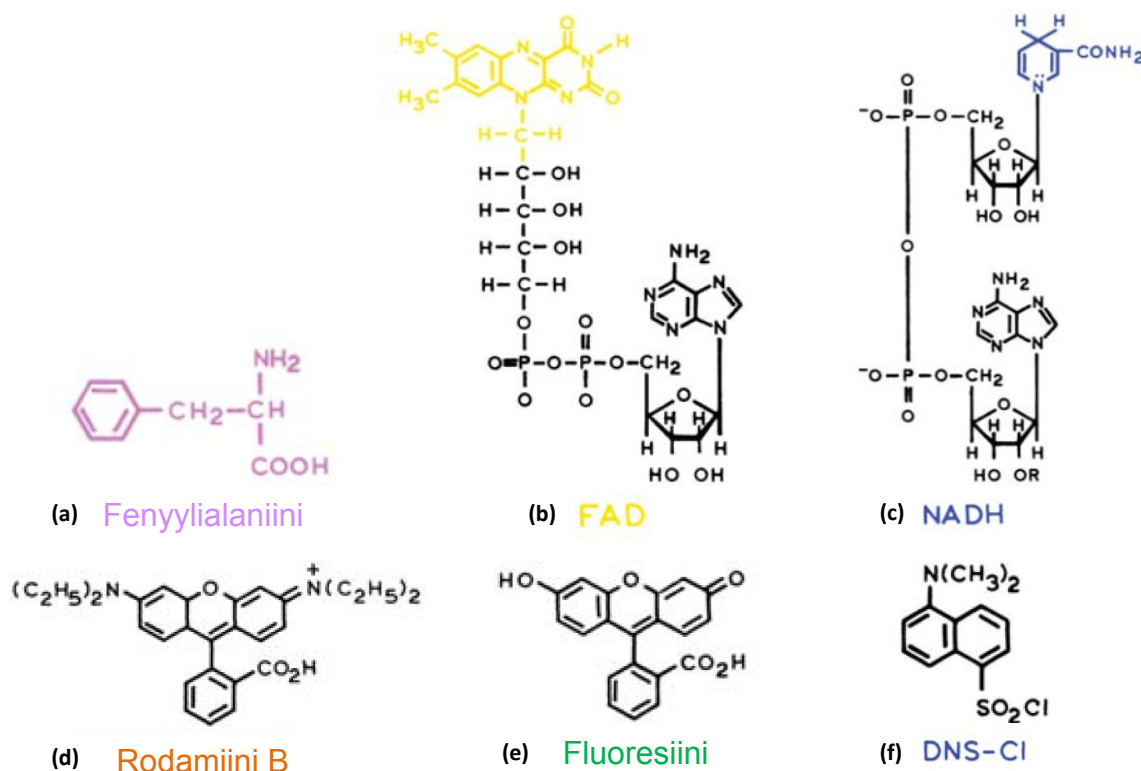


Kuva 2.4. Dansyylin absorbtiospektrit heksaanissa (H) ja n-butanolissa (B), sekä emissiospektrit heksaanissa, sykloheksaanissa (CH), tolueenissa (T), etyyliasetaatissa (EA) ja n-butanolissa. Liuottimen poolisuus kasvaa vasemmalta oikealle. (Muokattu lähteestä Lakowicz 2006, s. 206).

Lämpötilan kasvattaminen laskee yleisesti ottaen fluoresenssin elinaikaa, sillä lämpötilan nousu lisää molekyylien liikettä (Valeur 2001, s. 48). Liikkeen lisääntyessä myös molekyylienväliset törmäykset lisääntyvät, ja molekyylit pyörivät ja värähtelevät enemmän. Viritystilat pääsevät siis purkautumaan helpommin säteilemättömien reittien kautta. Lisäksi yleisesti liuoksen viskositeetti laskee lämpötilan laskiessa, jolloin myös dipolien uudelleenjärjestäytyminen hidastuu liuoksessa (Lakowicz 2006, s. 216). Liuoksen viskositeetin muutokset eri lämpötiloissa tuleekin huomioida aina mittauksia tehdessä. Liuoksen viskositeetin muutokset vaikuttavat voimakkaasti fluoresenssin elinaikaan eteenkin viskositeetin muutoksille herkillä fluoresoivilla molekyyliroottoreilla, joiden toiminta perustuu molekyylin pyörivän osan liikkeen hidastumiseen viskositeetin kasvaessa. Fluoresoivista molekyyliroottoreista on kerrottu tarkemmin kappaleessa 3.2.

2.4 Fluoroforit

Fluoresoivat aineet eli fluoroforit ovat yksi fluoresenssispektroskopian tärkeimmistä osaluokista. Laitteiston aallonpituudet ja aikaresoluutiot tulee valita aina käytössä olevien fluoroforien ominaisuuksien mukaan (Lakowicz 2006, s. 63). Käytetyt fluoroforit myös määrittävät sen, minkälaista tietoa mittauksista saadaan. Kuvassa 2.5. on esitetty erilaisia fluoroforeja.



Kuva 2.5. Esimerkkejä fluoroforeista. Luontaiset fluoroforit: (a) fenyyialaniini (b) flaviiniadeniinidinukleotidi (FAD) ja (d) NADH; R on vety NADH:ssa ja fosfaattiryhmä NADPH:ssa. Ulkoiset fluoroforit: (d) rodamiini B (e) fluoresiini ja (f) dansyylikloridi (DNS-Cl). (Muokattu lähteestä Lakowicz 2006, s. 2, 64 ja 67)

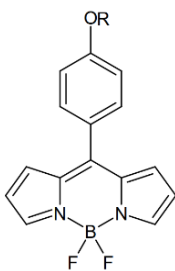
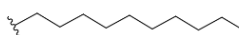
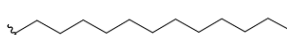
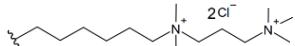
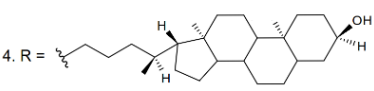
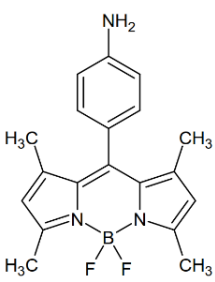
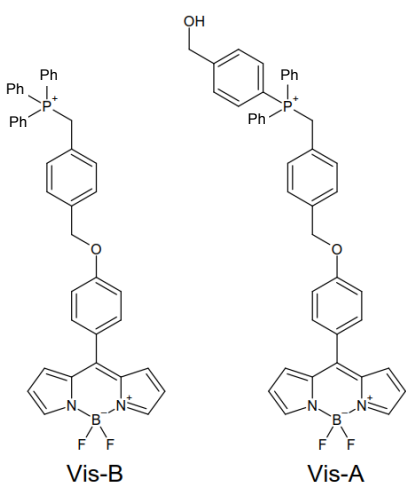
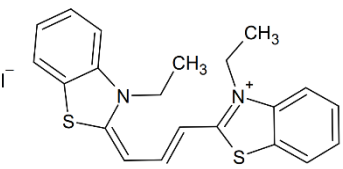
Fluoroforit voidaan jakaa karkeasti luontaisiin ja ulkoisiin fluoroforeihin. Luontaiset fluoroforit ovat luonnossa esiintyviä aineita, ja tällaisia ovat esimerkiksi aromaattiset aminohapot, flaviinit ja nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi (NADH) (Kuva 2.5.) (Lakowicz 2006, s. 63). Ulkoisia fluoroforeja lisätään näytteeseen fluoresenssin aikaansaamiseksi, kun sitä ei luontaisesti esiinny, tai näytteen spektriin liittyvien ominaisuuksien muuttamiseksi. Ulkoisia fluoroforeja on olemassa runsaasti, ja niitä kehitetään jatkuvasti lisää. Esimerkiksi fluoresiini, rodamiini ja dansyyli (DNS) ovat ulkoisia fluoroforeja (Kuva 2.5.) (Lakowicz 2006, s. 63).

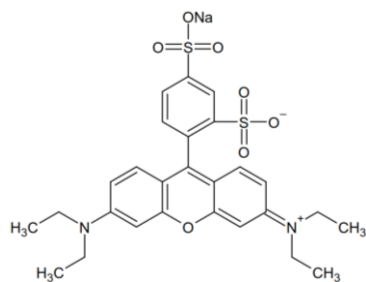
Oikeanlaisen fluoroforin valinta tiettyyn käyttötarkoitukseen on erittäin tärkeää. Esimerkiksi pyreeni on hydrofobinen väriaine ja hyvä tutkittaessa näytteen polaarisuutta. Toisaalta pyreenin johdannainen pyraniini on hydrofiilinen, jolloin se asettuu vesiliukoisiin alueisiin ja on herkkä pH:n muutoksille (Valeur 2001, s. 15). Joissain tapauksissa on hyvä, että väriaine reagoi vain vähäisesti ympäristönsä kemiallisiin muutoksiin. Tällaiset väriaineet soveltuvat parhaiten fluoresenssimikroskopiaan ja solujen luokitteluun (Valeur 2001, s. 15). Ympäristön kemiallisiin muutoksiin vähäisesti reagoivia fluoroforeja ovat esimerkiksi Dylight 649 ja Alexa 647 (Chen et al. 2008).

Fluoroforeja, joissa on pieni liikkuva osa ja jonka fluoresenssin purkautuminen riippuu ympäristön viskositeetista, kutsutaan molekyyliroottoreiksi. Molekyyliroottoreiden toiminta perustuu molekyylin pyörivän osan liikkeen hidastumiseen viskoosissa ympäristössä, mikä pidentää fluoresenssin elinaikaa (Valeur 2001, s. 230). Molekyyliroottoreiden viritystila purkautuu suurimmaksi osaksi fluoresoivien molekyyliroottoreiden sisäisten rotaatioiden kautta. Viritysenergiaa kuluu virittyneen fluoroforin roottoriosan pyörimiseen. Molekyylin pyörivän osan rotaation nopeus riippuu sen mikroympäristön viskositeetista. Kun mikroympäristön viskositeetti on suuri, roottoriosan pyöriminen hidastuu. Tällöin viritystila purkautuu hitaasti, ja fluoresenssin elinaika on suuri. Mikroympäristön viskositeetin ollessa pieni, roottoriosan pääsee pyörimään vapaammin. Fluoroforin viritystila purkautuu tässä tapauksessa nopeammin, ja fluoresenssin elinaika on lyhyt. Fluoresoivia molekyyliroottoreita käytetäänkin viskositeetin määrittämiseen erilaisissa systeemeissä. Viskositeetille herkistä molekyyliroottoreista kerrotaan lisää kappaleessa 3.2.

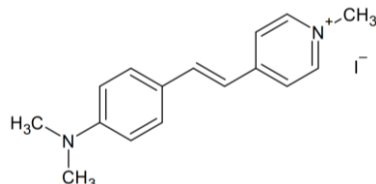
Taulukossa 2.1. on esitetty viskositeetin määrittämiseen soveltuvia fluoroforeja molekyylikaavoineen ja emissio- ja absorptioaallonpituuksineen sekä sovelluksia, joihin kyseisiä fluoroforeja on käytetty. Esimerkiksi boron-dipyrrometeenin (BODIPY) johdannaisia on käytetty useissa eri sovelluksissa, kuten solujen (Levitt et al. 2009, Kuimova et al. 2008), kasvaimien (Shimolina et al. 2017) ja aerosolipartikkeleiden (Hosny et al. 2016, Athanasiadis et al. 2016) viskositeetin tutkimisessa.

Taulukko 2.1. Viskositeetin mittaamiseen soveltuvia fluoroforeja, niiden molekyylikaavat, sovelluksia joihin fluoroforeja on käytetty ja niiden viritys- (λ_{ex}) ja emissioaallonpituudet (λ_{em}).

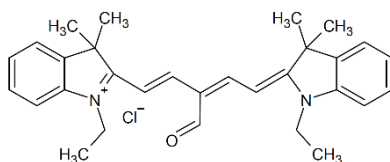
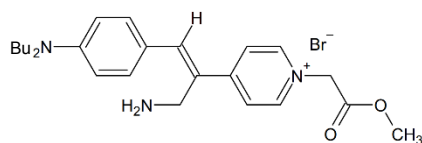
Molekyyli	Molekyylin rakennekaava	Sovellus	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)
BODIPY:n johdannainen	 <p>1. R = </p> <p>2. R = </p> <p>3. R = </p> <p>4. R = </p>	aerosolipartikkeiden viskositeetti [1, 2] aerosolipartikkeiden fluoresenssien elinajan ja mikroviskositeetin kuvantaminen [3] kasvaimien mikroviskositeetti [4] lipidien viskositeetti [5] solujen viskositeetti [6,7] Bacillus itiöiden viskositeetti [8]	495/515
BODIPY:n johdannainen		solujen mikroviskositeetin muutokset [9]	499/517
BODIPY:n johdannainen Vis-A ja Vis-B	 <p>Vis-B</p> <p>Vis-A</p>	mitokondrion viskositeetti elävissä soluissa [10]	501/514
Cy3		aerosolipartikkeiden mikroviskositeetti [11, 12]	558/571

**Sulforhodamine
B, Acid red**

aerosolipartikkeiden
viskositeetti ^[12]

565/586

DASPMI

viskositeetin seuraami-
nen sol-gel proses-
sissa ^[13]

475/605

RY3

solujen viskositeetti ^[14]
(400)609/
(450)648
**4-[(Z)-2-(4-(N,N-
dibutylamine)
phenyl)-1-
cyano-ethenyl]-
1-(2-metoxo-2-
oxoethyl)pyridi-
nium bromide**

solunsisäinen visko-
siteetti ^[15]

529/591

[1] Hosny et al. 2016

[4] Shimolina et al. 2017

[7] Kuimova et al. 2008

[10] Song et al. 2017

[13] Hungerford et al. 2009

[2] Athanasiadis et al. 2016

[5] Dent et al. 2015

[8] Loison et al. 2013

[11] Fitzgerald et al. 2016

[14] Peng et al. 2011

[3] Vyšniauskas et al. 2016

[6] Levitt et al. 2009

[9] Gupta et al. 2016

[12] Hosny et al. 2013

[15] Battisti et al. 2013

3. FLUORESENSSIMIKROSKOPIA

Fluoresenssimikroskopiasta on tullut biologian alalla yksi käytetyimmistä kuvantamismenetelmistä sen hyvän selektiivisyyden ansiosta (Lichtman et al. 2005). Menetelmää on pidetty lähinnä biokemistien ja biofyysikoiden työkaluna, mutta nykyään menetelmä on kasvattanut suuresti suosiota myös muilla aloilla. Fluoresenssia käytetään muun muassa bioteknologiassa, rikostekniikassa, geenianalyyseissä ja DNA-sekvensoinneissa (Basuki et al. 2013, de la Peña et al. 2016, Lubeck et al. 2012, Xu et al. 2014).

3.1 Elinaikaerotteinen fluoresenssimikroskooppi

Elinaikaerotteisen fluoresenssimikroskoopin toiminta (engl. fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) perustuu eri fluoroforien viritystilojen erilaisiin elinaikoihin. Tässä työssä käytetty FLIM on yksittäisfotonilaskentaan perustuva kuvantava laitteisto, joka mittaa fluoresenssin intensiteettiä ja vaimenemista paikan funktiona. Fluoroforin viritystilan elinajan pituus riippuu sen mikroympäristöstä. Tämän ansiosta fluoroforien ympäristön fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista saadaan tietoa mittaamalla fluoresenssin elinaikaa (Valeur 2001, s. 359). FLIM:n tärkein hyöty verrattuna pelkän fluoresenssin intensiteetin mittaamiseen on se, että fluoresenssin elinaika ei riipu fluoroforien konsentraatiosta tai laserin viritysintensiteetistä (Borst et al. 2010).

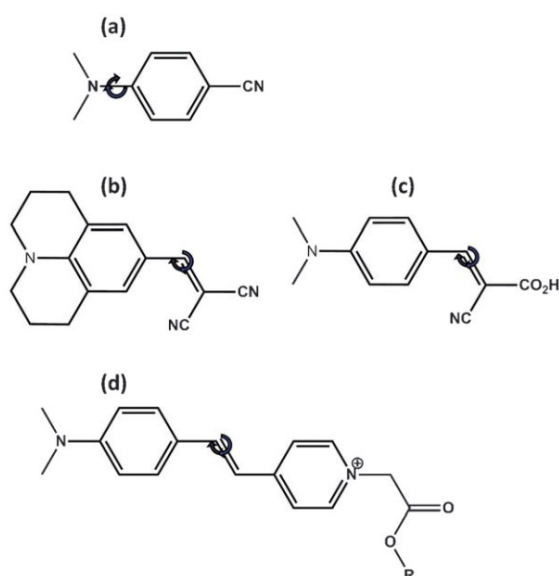
3.2 Viskositeetin tutkiminen fluoresenssin avulla

Viskositeetti on fluidien perusominaisuus, joka kuvaa fluidin kykyä vastustaa virtausta. Viskositeetti on kitkavoima, joka aiheutuu molekyylien liikkeestä toistensa ohi. (Graebel 2001, s. 27). Viskositeetti on makroskooppinen suure, joka menettää fysikaalisen merkityksensä molekyyllitasolla, mistä johtuen termiä mikroviskositeetti tulisi käyttää harkiten. Mikroskooppisesti viskositeetti on yhden partikkelin kokema kitkavoima diffuusion aikana (Mohanty et al. 2013). Mikroskooppinen viskositeetti aiheutuu partikkelin vuorovaikutuksesta sen ympäristön kanssa mikrometrien alueella.

Makroskooppisen viskositeetin mittaamiseen on useita menetelmiä, mutta nämä eivät sovellu mikroskooppisen viskositeetin tutkimiseen. Yleisesti käytettyjä viskosimetrejä ovat esimerkiksi rotaatioviskosimetri ja kapillaariviskosimetri. Rotaatioviskosimetrin toiminta perustuu pyörimisen synnyttämän liikkeen viskositeettivastukseen, joka kasvaa viskositeetin kasvaessa. Kapillaariviskosimetrin toiminta perustuu kapillaarin läpi kulkevan

virtauksen, sekä virtauksen aikaansaamiseksi tarvittavan paineen mittaamiseen. Perinteiset menetelmät viskositeetin määrittämiseen vahingoittavat näytettä, ja tutkittavaa näytettä tarvitaan yleensä suuria määriä. Viskositeetin mittaamiseen on kehitetty useita vaihtoehtoisia menetelmiä, jotka perustuvat spektroskopiin ja mikroskopiin menetelmiin (Loison et al. 2013). Tällaiset menetelmät kykenevät kuitenkin monesti vain yhden pisteen analysointiin. FLIM:n käyttö fluoresoivien molekyyliroottoreiden kanssa on menetelmä, jolla voidaan havainnollistaa suurempien alueiden mikroviskositeetin jakaumaa.

Fluoresoivat molekyyliroottorit ovat pienikokoisia synteettisiä fluoroforeja, joiden viritystilan purkautuminen aiheutuu molekyylin sisäisestä rotaatiosta, ja sen yhteydessä tapahtuvasta varaustensiirrosta (engl. twisted intramolecular charge transfer, TICT) (Levitt et al. 2009, Suhling et al. 2015, Kuimova 2012). Molekyylin pyörivän osan liikkeen nopeuteen vaikuttaa sen mikroympäristön viskositeetti. Viritysenergiaa kuluu virittyneen molekyylin roottoriosan pyörimiseen. Viskositeetin ollessa pieni, relaksaatio tapahtuu suurelta osin pyörimisen kautta, ja se on säteilemätöntä. Tästä johtuen myös fluoresenssin intensiteetti on pienempi ja elinaika lyhyempi. Vain osassa virityskerroista molekyyliroottorit fluoresoivat nopeasti virityksen jälkeen. Juoksevassa liuoksessa havaitaan lähes ainoastaan molekyyliroottoreiden nopea fluoresenssi. Viskoosissa liuoksessa havaitaan lisäksi ne virityskerrat, jotka emittoivat vasta pitkän ajan päästä virityksestä, sillä pyörimistä ei pääse tapahtumaan, ja siitä johtuva relaksaatio ei ole tehokasta. Näin sekä fluoresenssin intensiteetti, että elinaika ovat suuremmat viskoosissa liuoksessa. (Suhling et al. 2015). Tyypillisiä TICT-tyyppisiä molekyyliroottoreita on esitetty kuvassa 3.1.



Kuva 3.1. TICT-tyyppisten molekyyliroottoreiden rakenteita: (a) dimetyyliaminobentsonitriili (engl. dimethylaminobenzonitrile, BMABN); (b) 9-(disyanovinyyli) julolidiini (engl. 9-dicyanovinyl)julolidine, DCVJ); (c) 2-syano-3-(4-dimetyyliaminofenyli) akryylihapon metyyliesteri (engl. 2-cyano-3-(4-dimethylaminophenyl) acrylic acid methyl ester, CMAM); (d) 4-[4-(dimetyyliamino)styryyli]pyrydiini N-karboksymetyylalkyyliesteri (engl. 4-[4-(dimethylamino)styryl] pyridine N-carboxymethyl alkyl ester, DMASP-ester). Kuvaan on merkitty nuolilla molekyylien pyörivät osat. (Kuimova 2012).

Fluoresoivia molekyyliroottoreita on käytetty mikroviskositeetin mittaamiseen muun muassa aerosoleissa (Hosny et al. 2013), lipideissä, (Dent et al. 2015, Wu et al. 2013) bacillus itiöiden solukalvoissa (Loison et al. 2013) ja muissa biologisissa rakenteissa, kuten elävissä soluissa (Shimolina et al. 2017, Song et al. 2017, Gupta et al. 2016, Battisti et al. 2013, Kuimova 2012, Peng et al. 2011, Levitt et al. 2009, Kuimova et al. 2008).

BODIPY:n johdannaisia on käytetty useissa viskositeettitutkimuksissa. Kuimova (2012) tutki solujen viskositeettia käyttämällä elinaikaerotteista ja jatkuvatoimista fluoresenssimikroskooppia. Käytettyjä molekyyliroottoreita olivat muun muassa porfyriinidimeeri ja BODIPY-fenyyli- C_{12} . Tutkimuksessa havaittiin solusisäisen mikroviskositeetin olevan heterogeeninen ja hyvin korkea (~80 mPas). Lisäksi solujen mikroviskositeetti kasvoi (~360 mPas) solujen kuollessa. Hosny et al. (2013) tutki ilmakehän aerosolipartikkeleiden viskositeettia käyttämällä FLIM:a. Tutkimuksessa käytetyt molekyyliroottorit olivat Cy3, sulforodamiini B ja BODIPY- C_{10} . NaCl -aerosolien mikroviskositeetin havaittiin riippuvan NaCl:n molaalisuudesta, ja olevan suuruudeltaan 1–4 mPas. Sakkaroosien aerosolien mikroviskositeetti riippui faasien suhteellisesta kosteudesta, ja mikroviskositeetin suuruus oli 10–1000 mPas. Oleiinihapon aerosolien mikroviskositeetiksi saatiin 191–317 mPas.

Solujen mikroympäristön viskositeettia on tutkittu useilla muillakin molekyyliroottoreilla. Peng et al. (2011) tutki solujen viskositeettia RY3 -fluoroforilla, jonka roottoriosia koostuu karbonyyliryhmästä. Tutkimuksessa havaittiin RY3:n fluoresenssin elinajan kasvavan voimakkaasti viskoosissa mikroympäristössä verrattuna ympäristöön, jonka viskositeetti on hyvin alhainen. Matalaviskoosisessa ympäristössä, jossa RY3:n roottoriosia pääsi pyörimään vapaasti, fluoresenssin elinaika oli 200 ps. Viskoosissa ympäristössä fluoresenssin elinaika kasvoi 1450 ps:iin. Myös lämpötilan laskemisen havaittiin kasvattavan fluoresenssin elinaikaa ja edelleen systeemin mikroviskositeettia. Battisti et al. (2013) tutki solujen viskositeettia käyttämällä fluoroforina 4-[(Z)-2-(4-(N,N-dibutyyliamini) fenyyli)-1-syano-etyyli]-1-(2-metoksi-2-oxo-etyyli)pyridinium bromidia (4-[(Z)-2-(4-(N,N-dibutylamine) phenyl)-1-cyano-ethenyl]-1-(2-metoxy-2-oxoethyl)pyridinium bromide). Mikroympäristön viskositeetin kasvattamisen havaittiin myös tässä tutkimuksessa pidentävän fluoresenssin elinaikaa, mistä johtuen solujen mikroviskositeettia pystyttiin määrittämään FLIM:lla.

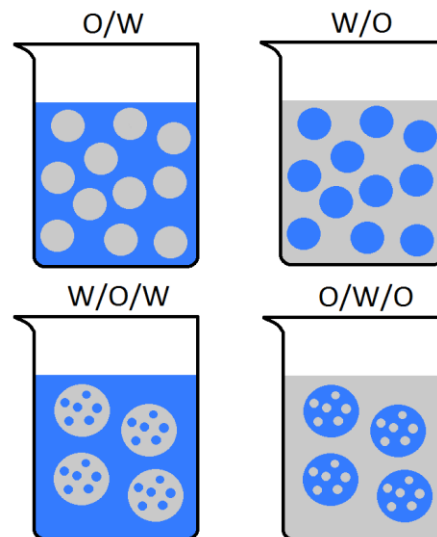
Hungerford et al. (2009) käytti BODIPY- C_{12} :a ja DASPMI:a tutkiessaan mikroviskositeetin muutoksia sol-gel prosessien aikana. Mikroviskositeettien muutosta pystyttiin seuraamaan jatkuvasti sol-gel prosessin aikana käyttämällä BODIPY- C_{12} :a ja DASPMI:a molekyyliroottoreina ja aikamerkittyä fluoresenssin elinajan mittaumenetelmää. Sol-gel prosesseissa käytettiin gellaanikumia hydrogeelin muodostukseen, ja tetraetyyliortosiliikaattia lasimaisen materiaalin muodostukseen. Erilaisia viskositeetille herkkiä molekyyliroottoreita ja niiden sovelluksia on esitetty lisää taulukossa 2.1.

4. HETEROGEENISET SYSTEEMIT

Heterogeeniset seokset koostuvat vähintään kahdesta toisiinsa sekoittumattomasta faasista. Esimerkiksi hiekan ja suolan seos, vaahdot ja emulsiot ovat heterogeenisiä seoksia. Heterogeenisten systeemien viskositeettia on hankala mitata mekaanisilla menetelmillä. Tässä tutkimuksessa on käytetty kahdenlaisia heterogeenisiä systeemejä, emulsioita ja kuituista nanoselluloosaa, joiden viskositeetin jakauma on pyritty määrittämään elinaikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla.

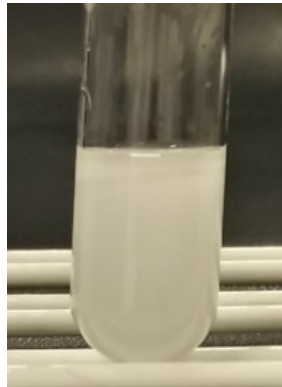
4.1 Emulsiot

Emulsio on vähintään kahdesta toisiinsa sekoittuvasta nestefaasista koostuva kolloidisysteemi. Nesteistä toinen on jatkuva faasi ja toinen dispergoitunut faasi. Yksinkertaisimmat emulsiotyypit ovat veden ja öljyn seoksia: vettä öljyfaasissa (engl. oil-in-water, O/W) ja öljyä vesifaasissa (engl. water-in-oil, W/O). Muita mahdollisia emulsiotyyppejä ovat esimerkiksi vesifaasissa oleva W/O emulsio (engl. water-in-oil-in-water, W/O/W) ja öljyfaasissa oleva O/W emulsio (engl. oil-in-water-in-oil, O/W/O) (Kuva 4.1.)



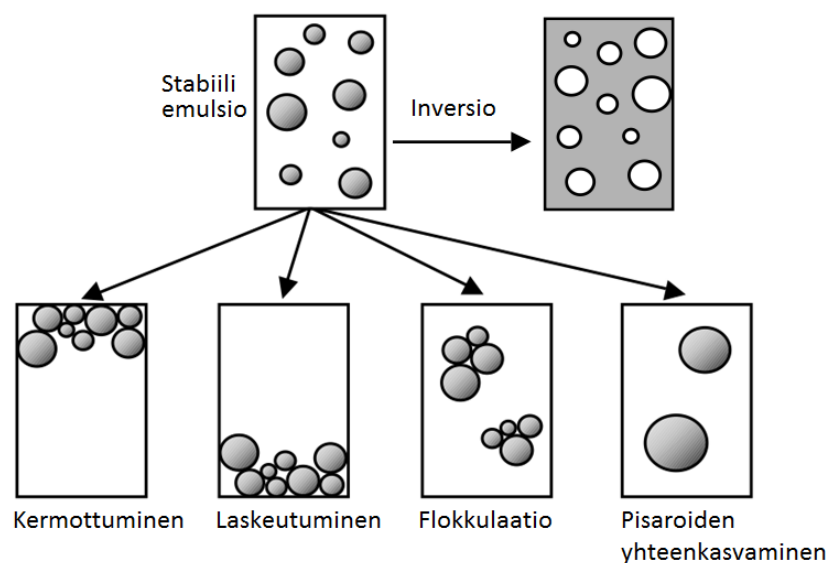
Kuva 4.1. Yksinkertaisimmat emulsiotyypit öljyä vedessä O/W ja vettä öljyssä W/O, sekä monimutkaisemmat emulsiotyypit, jossa öljyn emulsiopisaroiden sisällä on vesipisaroita W/O/W ja veden emulsiopisaroiden sisällä öljypisaroita O/W/O. Kuvan emulsiopisaroiden koot ovat liioiteltuja.

Emulsiopisaroiden halkaisija on yleensä suurempi kuin $0,2\ \mu\text{m}$, joskus jopa yli $50\ \mu\text{m}$ (Schramm 2014, s. 30). Emulsio voi sisältää erikokoisia emulsiopisaroita, jolloin emulsiota kutsutaan polydispersiiviseksi. Tietyinkokoisia emulsiopisaroita sisältävää emulsiota kutsutaan monodispersiiviseksi (McClements 2005, s. 10). Emulsiot ovat yleensä läpinäkymättömiä ja maitomaisia nesteitä. Kuvassa 4.2. on esitetty veden ja parafiiniöljyn muodostama emulsio. Mikäli emulsion partikkelikoko on hyvin pieni ($< 0,1\ \mu\text{m}$), muuttuu emulsio läpikuultavaksi (Becher 1965 s. 56).



Kuva 4.2. *O/W emulsio, parafiiniöljyä vedessä.*

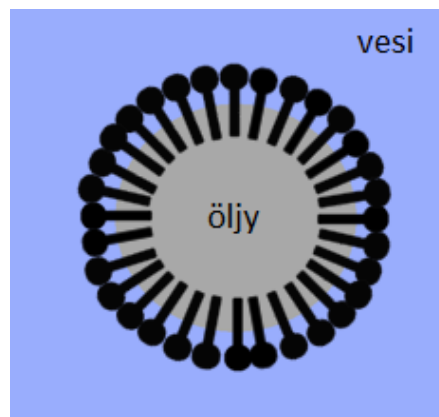
Emulsion katsotaan olevan stabiili, kun sen ominaisuudet eivät merkittävästi muutu ajan kuluessa. Suurin osa emulsioista ei ole termodynaamisesti stabiileja, mutta osa emulsioista voi pysyä stabiileina viikkojen tai jopa vuosien ajan. Emulsion stabiilisuutta voidaan parantaa lisäämällä emulsioon emulgaattoria, joka voi olla pinta-aktiivinen aine, polymeeri, hienojakoista kiinteää ainetta, tai näiden yhdistelmä (Schramm 2014, s. 7). Emulgaattoria voidaan käyttää myös apuna emulsion muodostamisessa. Kuvassa 4.3. on esitetty erilaisia emulsioiden epästabiilisuutta lisääviä prosesseja.



Kuva 4.3. *Emulsioiden epästabiilisuutta lisääviä prosesseja (Muokattu lähteestä McClements 2005, s. 6).*

Makroemulsiot ovat termodynaamisesti epästabiileja, mikäli eri faasien välinen pintajännitys on korkea (Becher 1965, s. 97). Emulsiopisarat kulkeutuvat yhteen muodostaen aggregaatteja, eli flokkuloituvat. Pisarat pyrkivät edelleen yhdistymään suuremmiksi pisaroiksi. Emulsiopisaroiden muodostaessa aggregaatteja ja yhdistyessä, nestefaasien tiheysero aiheuttaa emulsiopisaroiden hitaan nousemisen emulsion pinnalle eli kermotumisen, tai laskeutumisen pohjalle (Becher 1956, s. 150-151, McClements 2005 s. 6). Emulsio voi myös muuttua emulsiotyypistä toiseen, eli invertoitua.

Pinta-aktiiviset aineet lisäävät emulsion stabiiliutta muun muassa pienentämällä pintajännitystä, muuttamalla sähköstaattista repulsiota, lisäämällä elastisuutta ja lisäämällä pinnan viskositeettia (Schramm 2014, s. 129). Pinta-aktiiviset aineet koostuvat hydrofiilisesta ja hydrofobisesta päästä. Emulsiossa pinta-aktiiviset aineet muodostavat useasta molekyylistä koostuvan kalvon, joka asettuu jatkuvan ja dispergoituneen faasin faasirajalle. Pinta-aktiivisen aineen hydrofiilinen pää osoittaa tällöin vesifaasiin, ja hydrofobinen öljyfaasiin (Becher 1965, s. 97). Emulsion stabiloiminen pinta-aktiivisella aineella O/W emulsiossa on esitetty kuvassa 4.4.



Kuva 4.4. O/W emulsion stabiloiminen pinta-aktiivisella aineella. Pinta-aktiivisen aineen hydrofiilinen pää suuntautuu vesifaasiin ja hydrofobinen pää öljyfaasiin.

Emulgaattori on tehokkain silloin, kun sillä on pieni liukoisuus sekä jatkuvaan että dispergoituneeseen faasiin. Yksi yleisesti käytetty emulgaattori on natriumlauryylisulfaatti (engl. sodium dodecyl sulphate, SDS), jota käytetään esimerkiksi pesuaineissa, hammaspastaissa ja shampoissa vaahtoutumisen edistämiseen ja pintajännityksen alentamiseen (Muramoto et al. 2000). Pinta-aktiivinen aine voi aiheuttaa myös emulsion destabiloitumisen.

Emulsioiden makroviskositeetin laskennalliseen määrittämiseen on useita malleja. Taylor (1932) esitti mallia, joka ottaa huomioon jatkuvan ja dispergoituneen faasin viskositeetit

$$\mu_r = 1 + \left[2,5 \left(\frac{k+0,4}{k+1} \right) \right] V, \quad (4.1)$$

jossa μ_r on suhteellinen viskositeetti, V on dispergoituneen faasin tilavuuskerroin ja k on dispergoituneen faasin viskositeetin (μ_D) suhde jatkuvan faasin viskositeettiin (μ_C)

$$k = \frac{\mu_D}{\mu_C}. \quad (4.2)$$

Malli pätee ainoastaan emulsioille, joiden dispergoituneen faasin konsentraatio on alhainen, sillä suurilla konsentraatioilla pisarat alkavat yhdistyä, eikä pisaroiden muoto ole enää pyöreä.

Phan-Thien et al. (1997) ovat kehittäneet mallin emulsioille, joilla on alhainen kapillaariluku:

$$\mu_r^{\frac{2}{5}} \left(\frac{2\mu_r + 5k}{2 + 5k} \right)^{3/5} = \left(\frac{1}{1-V} \right). \quad (4.3)$$

Kapillaariluku kuvaa viskositeetin ja pintajännityksen välistä vuorovaikutusta kahden toisiinsa liukenemattoman fluidin välillä. Tämän mallin mukaan suhteellinen viskositeetti kasvaa lineaarisesti, kun dispergoituneen faasin alhaisilla konsentraatioilla, ja asymptootisesti kun V lähestyy arvoa 1.

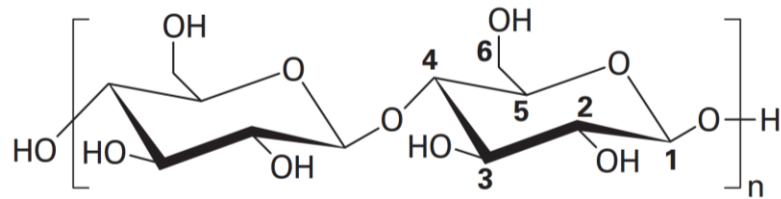
Emulsoiden viskositeetin määrittämiseen on muitakin laskennallisia menetelmiä, joista kaikki määrittävät viskositeetin dispergoituneen faasin tilavuuden suhteen, tai dispergoituneen ja jatkuvan faasin viskositeettien avulla (Farah et al. 2005). Mallit eivät kuitenkaan ota huomioon lämpötilan vaikutusta emulsion viskositeettiin.

4.2 Nanoselluloosa

Selluloosa on maailman yleisin ja eniten tutkittu uusiutuva materiaali (Kalia et al. 2013, Habibi et al. 2012, Medronho et al. 2012, Siró et al. 2010). Selluloosaa esiintyy puussa, puuvillassa, hampussa ja muissa kasvipohjaisissa materiaaleissa. Lisäksi levät, vaippaeläimet ja jotkut bakteerit syntetisoivat selluloosaa. (Kalia et al. 2013, Siró et al. 2010). Arvioiden mukaan selluloosaa tuotetaan vuosittain lähes 700 miljardia tonnia (Medronho et al. 2012). Selluloosaa on käytetty viimeisten vuosikymmenten aikana useissa eri sovelluksissa, kuten energianlähteenä, rakennusmateriaaleina, paperissa ja tekstiileissä (Kalia et al. 2013).

4.2.1 Selluloosan rakenne

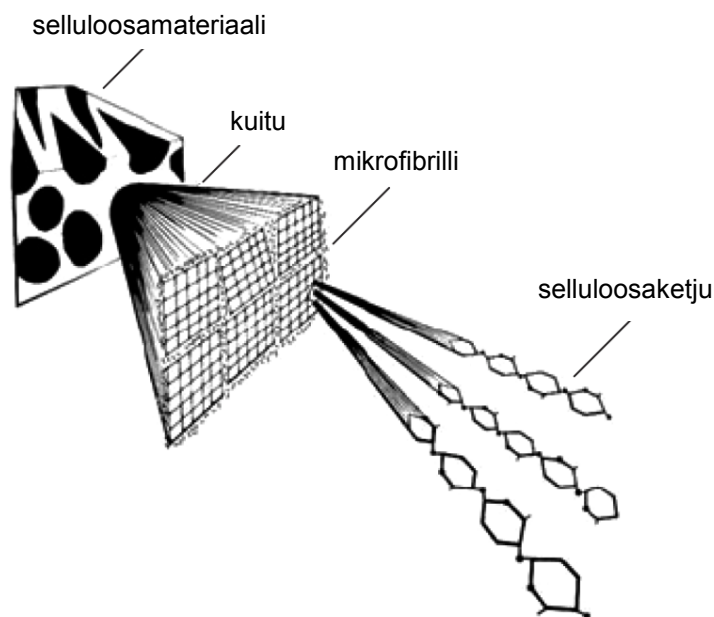
Selluloosa on kuituista, lujaa ja veteen liukenematonta materiaalia (Habibi et al. 2012). Selluloosa koostuu toistuvista β -D-glukoosimolekyyleistä, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa kovalenttisilla sidoksilla. Joka toinen glukoosiyksikkö on kiertynyt tasossa 180° . Selluloosa on pitkäketjuinen ja lineaarinen polymeeri, joka sisältää suuren määrän hydroksyyliyhymiä. (Klemm et al. 2005). Kuvassa 4.5. on esitetty selluloosan molekyyli rakenne.



Kuva 4.5. Selluloosan molekyyilirakenne (Dufresne 2012, s. 4).

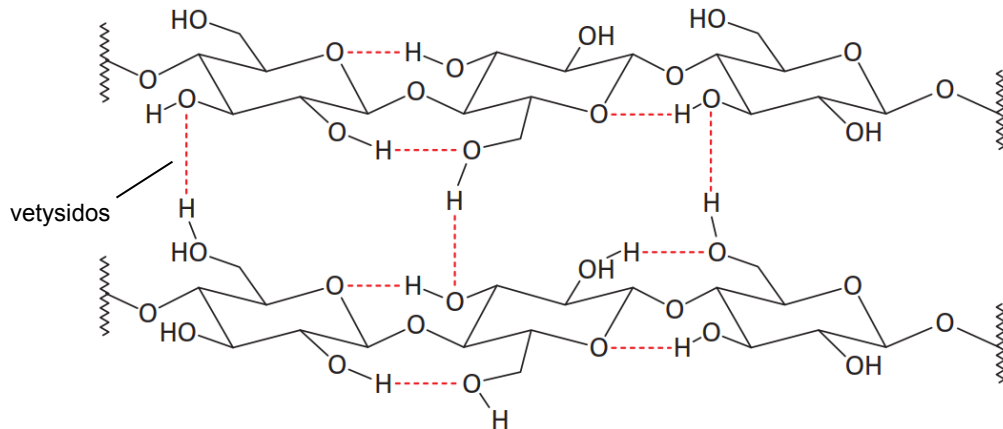
Selluloosan polymerisaatioaste, eli glukoosiyksiköiden määrä selluloosaketjussa, riippuu glukoosin esiintymispaikasta. Tavallisesti polymerisaatioaste on 2 000 ja 27 000 välissä. Esimerkiksi puun selluloosapolymeerit koostuvat noin 10 000 ja puuvillan selluloosapolymeerit noin 15 000 glukoosiyksiköstä. (Dufresne 2012, s. 4). Lyhyempiä selluloosaketjuja esiintyy yleisimmin soluseinissä (Habibi et al. 2012). Yhden glukoosiyksikön pituus on noin 0,515 nm, jolloin selluloosamolekyylin pituus on tavallisimmin 1–14 µm. Suurten ja huonosti liukenevien selluloosaketjujen pituutta ja polymerisaatioastetta on kuitenkin hankala määrittää. (Dufresne 2012, s. 4-5).

Luonnossa selluloosa ei esiinny yksittäisenä molekyylinä. Tavallisesti noin 36 yksittäistä selluloosamolekyyliä järjestäytyvät yhteen suuremmiksi yksiköiksi, joita kutsutaan alkeisfibrilleiksi. Alkeisfibrillit järjestäytyvät edelleen suuremmiksi mikrofibrilleiksi, jotka muodostavat lopulta selluloosakuituja (Kuva 4.6.). (Habibi et al. 2012).



Kuva 4.6. Selluloosamateriaalin rakenne kaaviokuvana (Muokattu lähteestä Dufresne 2012, s. 12).

Selluloosakuidut ovat pakkautuneet tiukasti yhteen pieniksi kiteiksi, joita pitää koossa molekyylien väliset ja sisäiset vetysidokset (Kuva 4.7.) (Habibi et al. 2012).



Kuva 4.7. Selluloosamolekyylien välisiä ja sisäisiä vetysidoksia. (Muokattu lähteestä Dufresne 2012, s. 12).

Mikrofibrillien leveydet, pituudet, muodot ja kiteisyydet voivat vaihdella riippuen selluloosan lähteestä, ja ne sisältävät kiteisiä ja amorfisia osia. Mikrofibrillien pituus on kuitenkin aina huomattavasti suurempi kuin niiden leveys. Mikrofibrillien leveys voi olla alhaisimmillaan 2–3 nm, ja suurimmillaan jopa 60 nm. (Dufresne 2012, s. 13).

4.2.2 Nanokuituinen selluloosa

Nanometrien paksuisia mikrofibrillejä kutsutaan nanokuiduiksi (Kalia et al. 2013). Nanokuidut jaetaan kolmeen eri luokkaan: kiteisiin (engl. nanocrystalline cellulose, NCC), kuituisiin (engl. nanofibrillated cellulose, NFC) ja bakteerien tuottamiin (engl. bacterial nanocellulose, BNC) (Naderi 2017). BNC:lla ja NCC:lla on monia ainutlaatuisia ominaisuuksia. NFC:a käytetään useissa teollisissa sovelluksissa, kuten lujittavana ainesosana paperin ja kartongin valmistuksessa, kosmetiikkatuotteiden viskositeetin säätelmissä ja vaipoissa hajuja poistavana aineena (Naderi 2017).

NFC:n ja NCC:n valmistusmenetelmät eroavat toisistaan. NCC:a valmistetaan käsittelemällä mikrofibrillejä vahvasti happamissa olosuhteissa, mikä saa aikaan selluloosamolekyylien amorfisten alueiden hydrolyysin. Mikrofibrilleistä muodostuu nanokokoisia lyhyitä sauvamaisia hitusia, joilla on korkea kiteisyys. NFC:a valmistetaan hajottamalla makroskooppista selluloosakuitua mekaanisesti, välttämällä vahvasti happamia olosuhteita. Tällä tavalla saadaan aikaiseksi nanokokoisia, pitkiä ja osittain amorfisia kuituja. Nämä kuidut ovat leveydeltään nanometrien kokoisia, ja pituudeltaan jopa useita mikrometrejä. (Pääkkö et al. 2007).

NFC:n viskositeetti muuttuu eksponentiaalisesti suhteessa sen konsentraatioon (Naderi 2017). Korkeilla leikkausjännityksillä NFC:n viskositeetti on alhainen, kun taas matalilla leikkausjännityksen arvoilla NFC:n rakenne muuttuu geelimäisemmäksi (Bhattacharya et al. 2012). Myös lämpötilan muutokset vaikuttavat NFC:n viskositeettiin, siten että NFC:n viskositeetti pienenee lämpötilan noustessa (Herrick et al. 1983). NFC:n viskositeetti on

korkea, mikäli se määritetään mekaanisilla menetelmillä. Viskositeettien arvot vaihtelevat alhaisilla leikkausjännityksillä 10–100 000 Pa·s NFC:n konsentraatioista riippuen (Bhattacharya et al. 2012). Korkeat viskositeettien arvot johtuvat nanokuiduista, jotka vastustavat virtausta mekaanisissa mittausmenetelmissä. Spektroskopisilla menetelmillä määritetty NFC:n mikroviskositeetti on todennäköisesti hyvin paljon alhaisempi verrattuna mekaanisin menetelmin määritettyyn NFC:n makroviskositeettiin.

5. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Tutkimuksissa on käytetty elinaikaerotteista fluoresenssimikroskooppia MicroTime 200. Elinaikaerotteiset fluoresenssimikroskooppikuvat analysoitiin SymPhoTime -ohjelmalla.

5.1 Laitteisto

Elinaikaerotteiden fluoresenssimikroskooppi MicroTime 200 koostuu neljästä perusosasta: Olympus IX71 -mikroskoopista, tiedonkeruu- ja säätöelektronikasta, viritysjärjestelmästä sekä optisesta pääyksiköstä (engl. main optical unit, MOU).

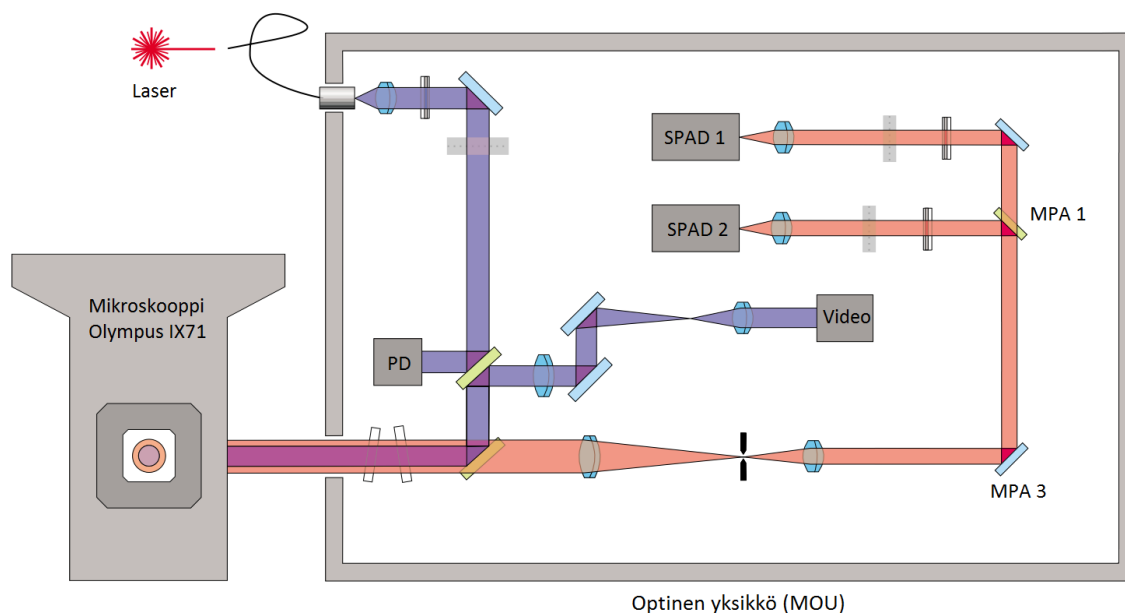
Olympus IX71 on käänteinen fluoresenssimikroskooppi, jonka optiikkaa hyödynnetään FLIM-kuvien ottamisessa. Mittauksissa käytettiin satakertaisesti suurentavaa öljyimmersion-objektiivia (numeerinen aukko N.A. = 1,4). Näytteet pipetoitiin mikroskooppilasille, joka asetettiin mikroskoopin näytteenpidikkeeseen. Näytteet kuvattiin mikroskooppilasin läpi, ja näyte tarkennettiin mikroskooppiin pystysuunnassa käsin tarkennuspyörällä, samalla tarkkailemalla tarkennuksen onnistumista mikroskoopin okulaarin kautta. Tarkennuspyörän hienosäätöasteikon yksi osaväli vastaa noin yhtä mikrometriä. Näyte siirretään kuvattavalle alueelle (x,y) -tasossa objektiivin säätöruuvien avulla.

Tiedonkeruu- ja säätöelektronikan keskeisin osa on PicoHarp 300 -moduuli, joka mittaa fluoresenssin elinaikaa aikamerkityllä aikaerotteisella (engl. time-tagged time-resolved, TTTR) mittaumenetelmällä. Kaksiulotteinen FLIM-kuva saadaan rakennettua fluoresenssisignaaleista, jotka rakennetaan fluoresenssin paikan kertovista merkkisignaaleista. Laajin alue, joka voidaan kuvata yhdellä mittauksella, on $80 \times 80 \mu\text{m}$. Mittapisteitä voi olla mittauksessa enintään 512×512 . Kuvien koko ja resoluutio valitaan tapauskohtaisesti. Diffraktiorajan määrittämä laitteiston erotuskyky paikan suhteen on noin 300 nm.

Viritysjärjestelmään kuuluvat laserien virta- ja säätöyksikkö PDL 800-B ja laserdiodien kytkentäyksikkö (engl. fiber coupling unit, FCU), joista ohjataan laserin taajuutta ja intensiteettiä. Virtayksikön oskillaattorin perustaajuus on 40 MHz, jota voidaan jakaa pienemmäksi muuttamalla toistotaajuutta. Viritysväli ohjataan FCU:sta kuitua pitkin optiseen pääyksikköön (engl. main optical unit, MOU), joka on esitetty kuvassa 5.1.

MOU koostuu neljästä eri osasta. Laserista lähtevä valo ohjataan ensin säteenjakajalle, josta 10–20 % säteen intensiteetistä heijastuu viritysväliä intensiteettiä (a.u., mielivalta-

nen yksikkö) mittaavaan valodiodiysikköön (engl. photodiode, PD). Loput valosta ohjataan puoliläpäisevälle peilille. Peili ohjaa viritysvalon näytteeseen mikroskoopin sivuportin ja objektiivin läpi. Näytteen emittoima, ja siitä siroava valo ohjataan mikroskoopin optiikan läpi takaisin pääyksikköön. Sironnut ja emittoitunut valo erotetaan pääyksikössä puoliläpäisevällä peilillä. Sironnut valo ohjataan edelleen tarkennuksen analysointiosaan (video). Emittoitunut valo ohjataan konfokaaliyksiköstä kahden säteenjakajan (MPA 3 ja MPA 1) kautta yksittäisfotonivyörydiodeille (engl. single photon avalanche diode, SPAD), jotka toimivat detektoreina. Detektoreiden mittausalue on 400–900 nm.



Kuva 5.1. Elinaikaerotteisen fluoresenssimikroskoopin pääyksikön (MOU) rakenne. Kuvaan on merkitty valodiodiysikkö PD, säteenjakajat MPA 3 ja MPA 1 sekä yksittäisfotonivyörydiodit SPAD 1 ja SPAD 2. (Muokattu lähteestä PicoQuant 2005).

Näytteestä sironnutta viritysvaaloa voidaan käyttää apuna mikroskoopin tarkennuksen analysointiin. Optisen pääyksikön säteenjakaja ohjaa valon tarkennuksen analysointiin, jossa valo ohjataan peilien kautta CCD-kameralle. Objektiiville saapuvaa valoa monitoroidaan jatkuvasti emissiosta riippumatta. Kohdentaminen on onnistunut, kun sopivalla intensiteetin arvolla intensiteettijakauman hienorakenne erottuu selvästi monitorikuvassa ja on muodoltaan symmetrinen. Kohdentamista arvioidaan myös fluoresenssin time trace -signaalin, eli jatkuvasti mitatun fluoresenssin intensiteetin avulla. Huonon kohdennuksen seurauksena fluoresenssin intensiteetti on heikko, ja vastaavasti onnistuneen kohdennuksen seurauksena havaitun fluoresenssin intensiteetti on suurempi.

Mittauksissa viritysvalona käytettiin pulssitettua PicoQuant LDH-P-C-485 -diodilaseria, jonka emissioaallonpituus on 483 nm ja aikaresoluutio 110 ps. Mittauksissa käytetty toistotaajuus oli 10 MHz. Näytteeseen päästetty valodiodin mittaama intensiteetti oli 30 a.u.,

ja mittauksissa käytetty suodatin päästi detektorille aallonpituudet 510 nanometristä ylöspäin. Valomikroskooppikuvat otettiin valokuvaamalla näytettä mikroskoopin okulaarin kautta. Mittaukset suoritettiin 22 °C lämpötilassa.

5.2 FLIM-kuvien analysointi

Elinaikaerotteiset fluoresenssimikroskooppikuvat analysoitiin SymPhoTime -ohjelmalla. FLIM-kuvissa erilaiset intensiteetin mukaan keskimääräistetyt elinajat (engl. intensity averaged lifetimes) erottuvat eri väreillä ja fluoresenssin intensiteetti kuvan valoisuusasteena siten, että kuvan korkein intensiteetti skaalautuu kirkkaimmaksi. Kuvia tarkasteltiin myös ilman intensiteettimodulaatiota, jolloin erot eri elinaikoja sisältävien alueiden välillä olivat selkeämmät.

Fluoresenssin elinajat laskettiin SymPhoTime -ohjelman sovituksella. Elinajasovitus tehtiin vaimenemiskuvaajaan vaimenemisen intensiteettimaksimista 60 nanosekuntiin asti. Ohjelma arvioi sovituksen virhettä χ^2 -testillä:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-p} \sum_{i=1}^N \left(\frac{R(t_i) - R_c(t_i)}{R(t_i)} \right)^2, \quad (5.1)$$

jossa N on pisteiden lukumäärä, p sovitettujen parametrien lukumäärästä riippumaton vakio, $R(t_i)$ on havaittu fluoresenssi ja $R_c(t_i)$ laskennallinen fluoresenssi ajan t funktiona (Valeur 2001, s. 181-182).

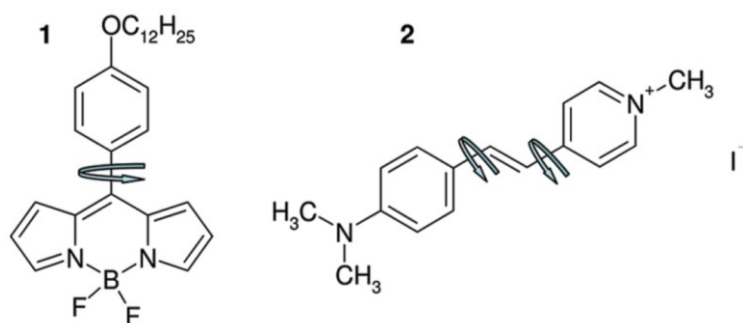
Kuvan alue, jolta elinaika laskettiin, valittiin tapauskohtaisesti. Elinajasovitus pyrittiin kuitenkin tekemään alueelle, joka on mahdollisimman tasalaatuinen, ja sovituksen virhe pysyi mahdollisimman lähellä yhtä. Mitä heikompi fluoresenssin intensiteetti oli tutkitulta alueelta, sitä suurempi virhe elinajasovitukseen muodostui. Ohjelmalla tarkasteltiin lisäksi elinaikajakaumia sekä joissain tapauksissa näytteiden intensiteettiprofiileja. Jokaisen systeemin kohdalla elinajat määritettiin useista kohdista, ja tuloksissa ilmoitettiin tulosten keskiarvo. Laskettujen viskositeettien virherajat laskettiin keskiarvon keskivirheellä.

5.3 Fluoroforit

Fluoresenssin elinaikaa voidaan käyttää ympäristön viskositeetin määrittämiseen molekyyliroottoreilla. Toisin kuin fluoresenssin intensiteetti, fluoresenssin elinaika ei riipu fluoroforien konsentraatiosta. (Kuimova 2012).

Mittauksissa käytettiin viskositeetin muutoksille herkkiä fluoroforeja 4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indatseenia (4,4'-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaacene, BO-DIPY-C₁₂, BODIPY) ja 4-(4-(dimetyyliamino)styryyli)-*N*-metyyli-pyridiniumjodidia (4-(4-(Dimethylamino)styryl)-*N*-methyl-pyridiniumiodine), DASPMI) (Kuva 5.2.). BODIPY:n valmisti Alexander Efimov (TTY) ja DASPMI:n toimitti Thermo Fisher Scientific.

Kyseisiä fluoroforeja on käytetty aiemmin tutkimuksissa, joissa on määritetty erilaisten monimutkaisten systeemien mikroviskositeettien jakaumia. (Hungerford et al. 2009, Rei et al. 2008, Kuimova et al. 2008, Levitt et al. 2009).



Kuva 5.2. Käytettyjen fluoroforien rakennekaavat: 1 BODIPY (4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indatseeni) ja 2 DASPMI (4-(4-(dimetyyliamino)styryyli)-N-metyyli-pyridiniumjodidi). Kuvaan on merkitty nuolilla molekyylien pyörivät osat. (Hungerford et al. 2009).

BODIPY on hydrofobinen, ja sen emissiospektrin maksimiaallonpituus on 510 nm metanolissa (Kuimova et al. 2008). DASPMI liukenee metanoliin, ja sen emissiospektrin maksimiaallonpituus on 605 nm metanolissa (Sabnis 2010, s. 132).

5.4 Näytteet

Tutkimuksessa käytetyt liuottimet olivat dimetyyliformamidi (DMF, valmistaja VWR), dimetyylisulfoksi (DMSO, valmistaja Fluka), etyleeniglykoli (valmistaja Fluka), parafiiniöljy (valmistaja Merck), glyseroli (valmistaja VWR) ja Milli-Q laitteistolla (valmistaja Millipore) puhdistettu vesi. Liuottimista valmistettiin kuusi erilaista emulsiota sekoittamalla 1 ml jatkuvaa faasia, 100 µl dispergoitunutta faasia ja 10 µl 0,4 m-% natriumlauryyilisulfaattiliuosta (SDS, valmistaja Fluka) keskenään, ja sonikoimalla emulsioita, kunnes ne olivat silmämääräisesti stabiileja. Valmistetut emulsiot olivat vettä parafiiniöljyssä, parafiiniöljyä vedessä, glyserolia parafiiniöljyssä, parafiiniöljyä glyserolissa, DMF:a parafiiniöljyssä ja etyleeniglykolia parafiiniöljyssä. Lisäksi tutkimuksessa käytettiin 0,5 % nanokuituista selluloosaa (NFC).

5.5 Kalibraatio

Sirkku Valkama määrittä diplomityössään kalibraatiosuorat BODIPY:n ja DASPMI:n fluoresenssien elinajoille viskositeetin muutoksen suhteen. Fluoresenssien elinajat mitattiin aikaerotteisella yksittäisfotonilaskennalla (engl. time-correlated single photon counting, TCSPC) BODIPY:lle metanoli-glyseroli -liuoksissa ja DASPMI:lle vesi-glyseroli -liuoksissa. Metanoli-glyseroli ja vesi-glyseroli -liuosten makroviskositeetit mitattiin materiaaliopin laboratoriossa Anton Paar MCR301 reometrillä 20 °C vakio-lämpötilassa.

Fluoresenssien elinajat määritettiin laserlaboratoriossa 22 °C huoneenlämpötilassa. Kalibraatiosuorat sovitettiin fluoresenssien elinaikojen logaritmisten arvojen ja liuosten viskositeettien logaritmisten arvojen suhteen. BODIPY:lle määritetty kalibraatiosuora on

$$\log \tau = 0,49 \log \mu - 0,83 \quad (5.2)$$

ja DASPMI:lle

$$\log \tau = 0,45 \log \mu - 1,24. \quad (5.3)$$

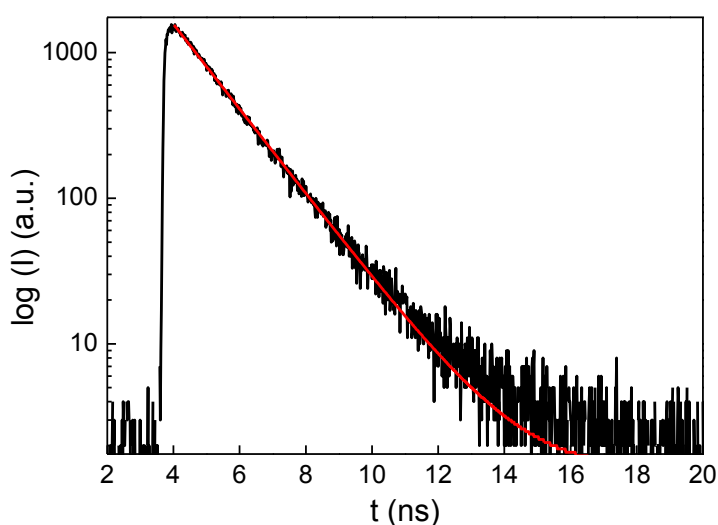
Kalibraatiomittauksissa tutkittujen liuosten makroviskositeettien arvot olivat BODIPY:lle 20–1330 mPas ja DASPMI:lle 60–1330 mPas.

6. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Tutkimuksessa tarkasteltiin BODIPY:n ja DASPMI:n fluoresenssien elinaikojen jakaumia erilaisissa puhtaissa liuottimissa, emulsioissa ja nanokuituisessa selluloosassa. Tutkimukset tehtiin elinaikaeroitteisella fluoresssimikroskoopilla. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää, miten väriaineen fluoresenssin elinajan määrittämistä voidaan hyödyntää heterogeenisten näytteen viskositeetin määrittämisessä. Kaikki mittaukset suoritettiin huoneenlämpötilassa 22 °C viritysaallonpituudella $\lambda_{ex} = 483$ nm.

6.1 Puhtaat liuottimet

Menetelmän toimivuuden ja luotettavuuden tutkimiseksi mittaukset aloitettiin määrittämällä erilaisten puhtaiden liuottimien mikroviskositeetteja. Puhtaiden liuottimien viskositeetit määritettiin FLIM:lla mittaamalla BODIPY:n ja DASPMI:n fluoresenssien elinaikoja eri liuottimissa. Mitatuista fluoresenssin elinajoista määritettiin viskositeetit puhtaille liuottimille, käyttäen väriaineille määritettyjä kalibraatiosuoria (5.2 ja 5.3). Tutkitut puhtaat liuottimet olivat dimetyyliformamidi (DMF), dimetyylisulfoksi (DMSO), etyleeniglykoli, parafiiniöljy ja glyseroli. Kaikki BODIPY:lla mitatut puhtaiden liuottimien fluoresenssin intensiteetin vaimenemiskuvaajat olivat yksieksponentiaalisia. Parafiiniöljyn fluoresenssin intensiteetin vaimenemiskuvaaja on esitetty kuvassa 6.1.



Kuva 6.1. BODIPY:lla mitattu parafiiniöljyn fluoresenssin intensiteetin vaimenemiskuvaaja ja sen yksieksponentiaalinen sovite.

Veden viskositeetin kirjallisuusarvo on lähellä DMF:n viskositeettia, joten se jätettiin määrittämättä kokeellisesti. Parafiiniöljyn viskositeetille ei ole saatavilla yksiselitteistä arvoa, sillä se riippuu parafiiniöljyn koostumuksesta. Parafiiniöljyn ja glyserolin viskositeetit ovat BODIPY:n kalibraatioalueella, mutta määritetyt viskositeetit poikkeavat silti hieman kirjallisuusarvoista. Etenkin parafiiniöljyn määritetyt viskositeettien arvot olivat kuitenkin yhteneväisiä kaikissa BODIPY:lla tehdyissä mittauksissa. Näytteiden viskositeettien kirjallisuusarvot, BODIPY:n fluoresenssin elinajat eri liuottimissa ja elinajoista määritetyt viskositeetit on esitetty taulukossa 6.1.

Taulukko 6.1. Puhtaiden liuottimien viskositeettien kirjallisuusarvot μ_{kirj} , mitatut BODIPY:n fluoresenssin elinajat τ eri liuottimille ja elinajoista määritetyt viskositeettien μ arvot.

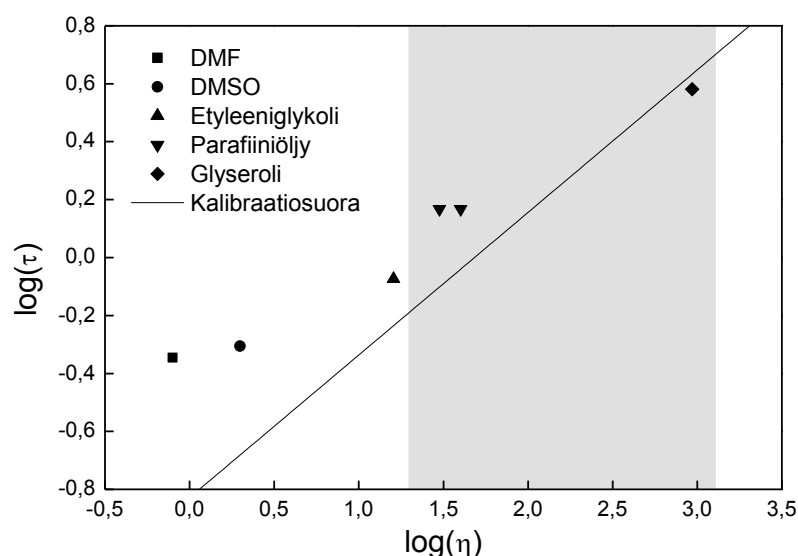
Liuotin	$\mu_{kirj}^{[1]}$ (mPas)	τ (ns)	μ (mPas)
Vesi*	0,890	-	-
DMF*	0,794	0,45	$10 \pm 0,1$
DMSO*	1,987	0,5	$12 \pm 0,4$
Etyleeniglykoli*	16,1	0,84	$35 \pm 0,4$
Parafiiniöljy	30-40 ^[2]	1,47	106 ± 2
Glyseroli	934	3,81	715 ± 40

[1] Lide 2009, s. 6-176

[2] Merck 2016

* kalibraatioalueen ulkopuolella

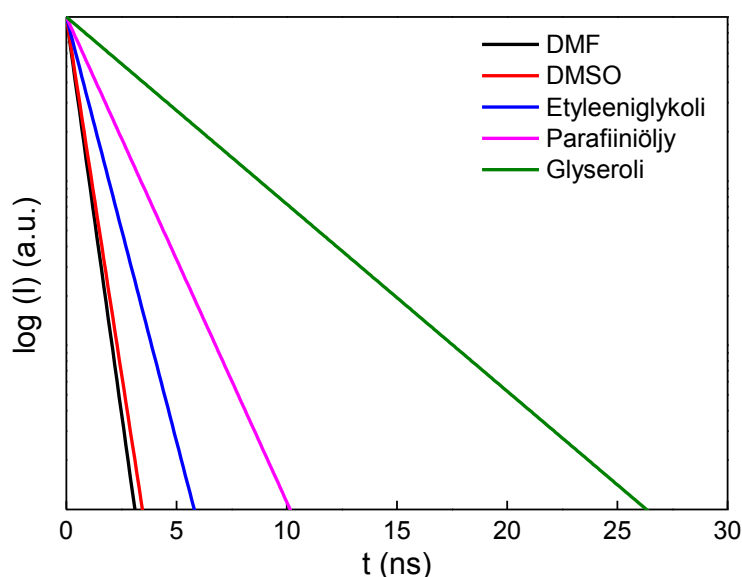
BODIPY:n kalibraatiosuora (yhtälö 5.2) ja mitatut elinaikojen logaritmiset arvot on esitetty viskositeettien logaritmisten arvojen funktiona kuvassa 6.2.



Kuva 6.2. BODIPY:n kalibraatiosuora ja puhtaille liuottimille mitattujen elinaikojen logaritmiset arvot suhteessa kirjallisuudessa annettujen viskositeettien logaritmiin arvoihin. BODIPY:n kalibraatioalue on harmaalla taustalla.

Kuvasta 6.2. huomataan määritettyjen viskositeettien arvojen poikkeavan kirjallisuusarvoilla määritetystä kalibraatiosuorasta etenkin alhaisilla fluoresenssin elinajoilla. Liuoksen viskositeetin ollessa alle 20 mPas, fluoresenssin elinaika ei riipu enää lineaarisesti viskositeetistä. Viskositeetin ollessa alhainen, BODIPY:n fluoresenssin elinajat ovat hyvin pieniä, sillä molekyylin pyörivä osa pääsee liikkumaan nopeasti. Alhaisia elinaikoja ei näin ollen saada erotettua toisistaan tarkasti alhaisilla viskositeeteilla. Viskositeetin kasvaessa molekyyliroottorin liike hidastuu ja fluoresenssin elinajat kasvavat. Kuvasta 6.2. havaitaan laskennallisten viskositeettien olevan tarkempia korkeammilla fluoresenssin elinajoilla. BODIPY ei siis tämän perusteella sovellu viskositeetin määrittämiseen aineilla, joiden viskositeetti on alhainen. Korkeammilla viskositeettien arvoilla BODIPY:lla saadaan määritettyä kohtuullisen tarkkoja viskositeettien arvoja.

Kokeelliset vaimenemiskuvaajat eivät ole täysin vertailukelpoisia taustan vaikutuksen ja intensiteettien vaihteluiden vuoksi. Kuvassa 6.3. on esitetty taulukon 6.1. arvoista eri liuottimille yhtälöllä 2.7 lasketut normitetut vaimenemiskuvaajat. Vaimenemiskuvaajista havaitaan selvästi fluoresenssin elinajan kasvaminen liuottimen viskositeetin kasvaessa.



Kuva 6.3. DMF:n, DMSO:n, etyleeniglykolin, parafiiniöljyn ja glyserolin lasketut normitetut vaimenemiskuvaajat. Mittauksissa käytettiin väriaineena BODIPY:a. Kuvaajat on laskettu elinajoista, jotka on esitetty taulukossa 6.1.

DASPMI:a käyttäen mitattiin ainoastaan parafiiniöljyn ja glyserolin elinajat. DASPMI:n kalibraatioalue oli 60–1300 mPas, eikä DASPMI:lla pystytty erottamaan alhaisia viskositeetteja toisistaan. Mitatuista kaksieksponentiaalisista vaimenemiskäyristä määritettiin saaduille fluoresenssin elinajoille viskositeetit käyttämällä DASPMI:n kalibraatiosuoraa (yhtälö 5.3). Hydrofiilisenä DASPMI ei kuitenkaan sekoittunut tasaisesti parafiiniöljyyn, ja lasketut viskositeettien arvot olivat huomattavasti parafiiniöljyn viskositeetin kirjallisuusarvoa suurempia. Parafiiniöljylle saadut elinajat eivät olleet luotettavia, ja tästä johtuen ne jätettiin pois analyysistä. Mitatut DASPMI:n fluoresenssin elinaikojen arvot

glyserolissa kullekin elinaikakomponentilla ja lasketut viskositeettien arvot on esitetty taulukossa 6.2.

Taulukko 6.2. DASPMI:lla mitattu glyserolin vaimenemiskäyrän kaksiekspONENTIAALISESTA sovituksesta määritetyt elinajat τ_1 ja τ_2 ja niiden prosentuaaliset osuudet, amplitudipainotteiset elinaikojen keskiarvot $\langle\tau\rangle$ ja elinajoista määritetyt viskositeetit μ_1 , μ_2 ja $\langle\mu\rangle$.

Liutotin	τ_1 (ns) [%]	μ_1 (mPas)	τ_2 (ns) [%]	μ_2 (mPas)	$\langle\tau\rangle$ (ns)	$\langle\mu\rangle$ (mPas)
Glyseroli	1,02 [93]	629 ± 17	2,13 [7]	3288 ± 103	1,10	611 ± 30

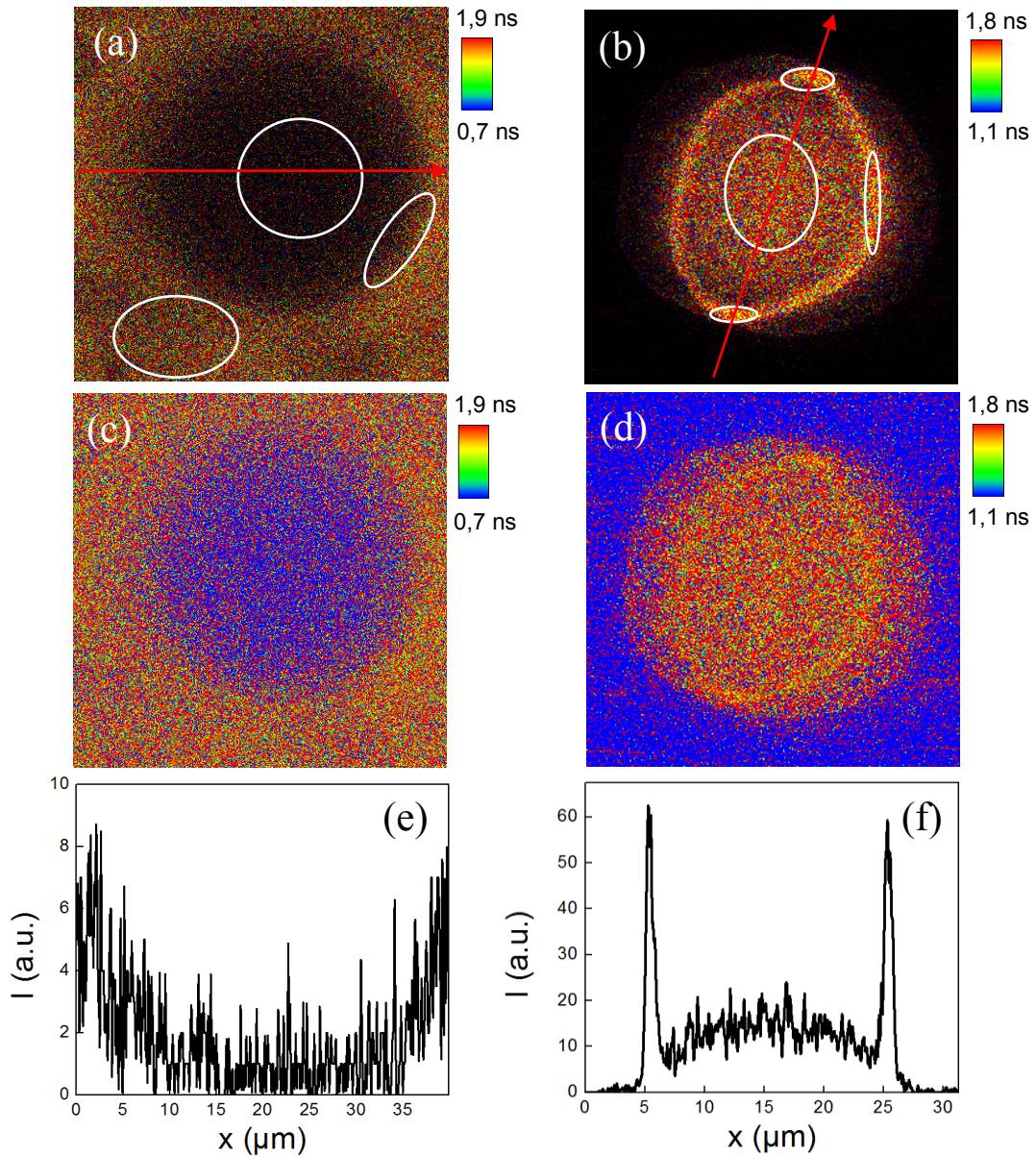
Mittaustuloksissa havaittiin kahta eri fluoresenssin elinaikaa, eli DASPMI ei sekoittunut täysin tasaisesti glyseroliin. Lyhyempi elinaika antaa glyserolin viskositeetin, mutta mukana on lisäksi pieni osuus pitkäikäistä komponenttia, joka antaa hyvin suuren viskositeetin. Glyserolin viskositeetiksi saatiin määritettyä kirjallisuusarvoa paremmin vastaava arvo BODIPY:lla kuin DASPMI:lla. Kumpikaan väriaine ei kuitenkaan sovellu hyvin matalien viskositeettien mittaamiseen. Menetelmä soveltuu siis saatujen tulosten perusteella melko hyvin mittaamaan viskositeettia liuottimille, joihin väriaine liukenee hyvin, ja joiden viskositeetti on käytetyn fluoroforin kalibraatioalueella.

6.2 Emulsiot

Homogeenisten näytteiden tutkimisen jälkeen mittauksissa siirryttiin heterogeenisten näytteiden tutkimiseen. Mittauksissa pyrittiin selvittämään erilaisten emulsioiden avulla, kuinka luotettavasti käytetyllä menetelmällä pystytään määrittämään heterogeenisten seosten mikroviskositeettien jakaumia. Emulsiot valmistettiin liuottimista, joiden mikroviskositeetteja oltiin mitattu jo puhtaita liuottimia tutkittaessa. Kaikki emulsiot valmistettiin sekoittamalla 1 ml jatkuvaa faasia, 100 μ l dispergoitunutta faasia ja 10 μ l emulgaattorina käytettyä natriumlauryylisulfaattia (engl. sodium dodecyl sulphate, SDS) keskenään, ja sonikoimalla emulsioita, kunnes ne olivat silmämääräisesti stabiileja. BODIPY:n fluoresenssin elinaikoja mitattiin kuudessa eri emulsiossa: vettä parafiiniöljyssä, parafiiniöljyä vedessä, glyserolia parafiiniöljyssä, parafiiniöljyä glyserolissa, DMF:a parafiiniöljyssä ja etyleeniglykolia parafiiniöljyssä. BODIPY on hydrofobinen molekyyliroottori, mistä johtuen BODIPY liukenee hyvin parafiiniöljyyn.

Koska emulsiot ovat heterogeenisiä seoksia, niiden FLIM-kuvat eivät ole jakautuneet tasaisesti erilaisten fluoresenssin elinaikojen ja intensiteettien suhteen. Fluoresenssin elinajat tulee siis määrittää eri kuvien eri kohdista kullekin mittaukselle. Elinajat määritettiin tutkimuksessa pääosin emulsiopisaran kohdalta, pisaran reunalta ja jatkuvasta faasista usealle eri mittaukselle, ja tuloksiin laskettiin eri mittausten keskiarvot. Kaikki BODIPY:lla määritetyt elinaikojen vaimenemiskäyrät olivat yksiekspONENTIAALISIA. Kuvassa 6.3. on esitetty BODIPY:lla mitattu FLIM-kuva vettä parafiiniöljyssä ja parafiiniöljyä vedessä -emulsiosta, sekä alueet joilta fluoresenssin elinajat on määri-

tetty. Eri värit kuvaavat eri fluoresenssin elinaikojen arvoja ja eri tummuusasteet fluoresenssin intensiteetin suuruutta kuvissa 6.4. (a ja b).



Kuva 6.4. Intensiteettimoduloitu FLIM-kuva BODIPY:lla mitatuista (a) vettä parafiiniöljyssä -emulsiosta ja (b) parafiiniöljyä vedessä -emulsiosta, joihin on merkitty viskositeettimittausten alueet, FLIM-kuvat ilman intensiteettiä (c) vettä parafiiniöljyssä ja (d) parafiiniöljyä vedessä -emulsioista sekä FLIM-kuvista määritetty normitettu fluoresenssin intensiteetti (e) vettä parafiiniöljyssä ja (f) parafiiniöljyä vedessä -emulsioille FLIM-kuviin merkittyjen nuolten kohdilta. FLIM-kuvat on esitetty elinaika-asteikoilla, jotka on esitetty kuvien oikeassa reunassa. FLIM-kuvien koko on (a, c) $40 \times 40 \mu\text{m}$ ja (b, d) $30 \times 30 \mu\text{m}$.

Kuvista 6.4. (a ja b) havaitaan alueiden, joihin väriaine liukenee paremmin, olevan intensiteetiltään korkeampia. Vesi-parafiiniöljy -systeemeissä BODIPY liukenee paremmin parafiiniöljyyn, mistä johtuen vesifaasiin intensiteetit ovat FLIM-kuvissa selkeästi alhaisemmat. Intensiteetin havaitaan muuttuvan emulsiopisaran kohdalla ja jatkuvassa

faasissa myös normitettujen fluoresenssin intensiteetin kuvaajista (Kuva 6.4. (e ja f)). Havaittu fluoresenssi kuvassa 6.4. (a) aiheutuu pisaran pinnalla ja ulkopuolella olevasta BODIPY:sta.

Parafiiniöljyä vedessä -emulsion intensiteettimoduloidusta FLIM-kuvasta ja FLIM-kuvasta ilman intensiteettiä (Kuva 6.4 (b ja d)) havaitaan heijastus, joita havaittiin useissa muissakin samantyyppisissä FLIM-kuvissa, joissa väriaine on jäänyt faasien rajapinnalle. Syntynyt heijastus aiheutuu mitatun emulsiopisaran pallomaisesta muodosta sekä suuresta taitekerroinerosta jatkuvan ja dispergoituneen faasin välillä. Pisaroiden pallomaiset rakenteet toimivat pallolinssien tapaan, ja aiheuttavat heijastukset taittaessaan valoa. Kuvasta 6.4. (f) fluoresenssin intensiteetissä havaitaan piikit emulsiopisaran rajapinnoilla, eli BODIPY:a on kertynyt faasien rajapinnalle. Tästä huolimatta viskositeetti pisaran reunalla on lähes sama kuin emulsiopisaran keskikohdassa. BODIPY:lla mitattujen emulsioiden määritetyt viskositeetit eri mittausalueilta on esitetty taulukossa 6.3.

Taulukko 6.3. BODIPY:lla mitattujen emulsioiden määritetyt viskositeetit μ eri mittausalueilta. Lihavuoidut arvot osoittavat, minkä alueen viskositeetin kukin mittaus on määrittänyt, ja sulkeissa olevat arvot eivät vastaa mitatun alueen viskositeettia.

Emulsio	Mitatettu alue	μ (mPas)
Vesi parafiiniöljyssä	Emulsiopisaran keskikohta	(101 \pm 2)
	Emulsiopisaran reuna	(104 \pm 1)
	Jatkuva faasi	110 \pm 2
Parafiiniöljy vedessä	Emulsiopisaran keskikohta	111 \pm 3
	Emulsiopisaran reuna	102 \pm 2
	Jatkuva faasi	(159 \pm 44)
Glyseroli parafiiniöljyssä	Emulsiopisaran keskikohta	(116 \pm 2)
	Jatkuva faasi	113 \pm 2
Parafiiniöljy glyserolissa	Emulsiopisaran keskikohta	122 \pm 2
	Jatkuva faasi	(164 \pm 21)
DMF parafiiniöljyssä	Emulsiopisaran keskikohta*	50 \pm 3
	Jatkuva faasi	70 \pm 1
Etyleeniglykoli parafiiniöljyssä	Emulsiopisaran keskikohta	(107 \pm 0,3)
	Jatkuva faasi	108 \pm 1

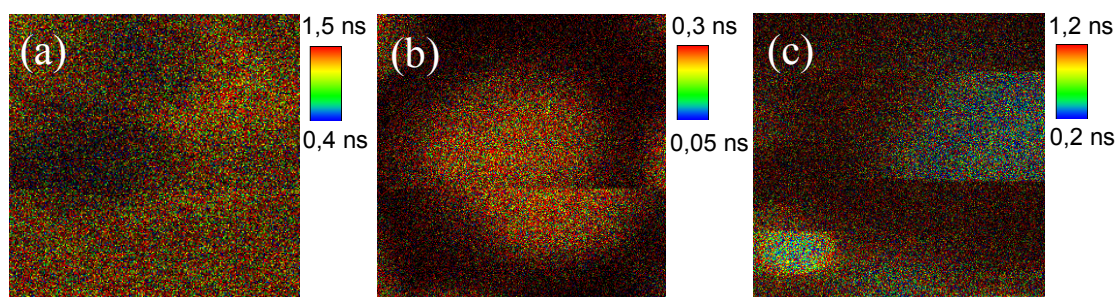
*alhainen liuottimen viskositeetti

Vettä parafiiniöljyssä -emulsion mittauksissa saatiin ainoastaan parafiiniöljyä vastaavia viskositeetin arvoja, mikä johtuu BODIPY:n hydrofobiisuudesta ja hyvästä liukoisuudesta parafiiniöljyyn. Mittaukset antoivat ainoastaan parafiiniöljyn viskositeetin myös systeemeissä parafiiniöljy vedessä, glyseroli parafiiniöljyssä, parafiiniöljy glyserolissa ja etyleeniglykoli parafiiniöljyssä -emulsioille, vaikkakin FLIM-kuvissa jatkuva faasi ja emulsiopisara erottuivat selkeästi toisistaan. Tämä johtuu siitä, että FLIM-kuvissa keskimääräinen elinaika on laskettu intensiteettien suhteen. Siksi esimerkiksi kuvan

6.4. (a) keskellä intensiteetin ollessa heikko, taustan osuus intensiteetistä korostuu. Taustassa on mukana sirontaa, eli laserpulssin leveyden kestävä komponenttia (sininen korostuu) ja mittaukseen käytetyn elektroniikan aiheuttamaa ajasta riippumatonta komponenttia (punainen korostuu). Saatu parafiiniöljyn viskositeetti vettä parafiiniöljyssä -emulsiossa vastaa hyvin aiemmin määritettyä parafiiniöljyn laskennallista viskositeetin arvoa (Taulukko 6.1.).

Parafiiniöljy vedessä ja parafiiniöljy glyserolissa -emulsioissa jatkuvan faasin viskositeetin virhe on suuri. Tämä johtuu FLIM-kuvien heikosta fluoresenssin intensiteetistä emulsiopisaran jatkuvan faasin alueella, joka aiheutuu BODIPY:n vähäisestä liukoisuudesta veteen ja glyseroliin. Jatkuvan faasin viskositeetti antaa näissä tapauksissa ainoastaan parafiiniöljyn viskositeetin, joka kuitenkin poikkeaa huomattavasti parafiiniöljyn kirjallisuusarvosta ja aikaisemmin määritetystä laskennallisesta arvosta. Myös viskositeetin poikkeama johtuu suurilta osin jatkuvan faasin heikosta fluoresenssin intensiteetistä FLIM-mittauksissa.

DMF parafiiniöljyssä ja etyleeniglykoli parafiiniöljyssä -emulsiot olivat melko epästabiileja: emulsiopisarat olivat heti sekoituksen jälkeen pieniä, ja pisarat liikkui paljon ja kasvoivat herkästi yhteen. Tämä heikensi FLIM-kuvien laatua ja vaikutti myös mahdollisesti mitattujen fluoresenssin elinaikojen luotettavuuteen. Aikaisemmassa tutkimuksessa tutkittavan alueen liikkeen on havaittu kasvattavan fluoresenssin elinaikaa (Paronen, 2016 s. 51 ja 52). Pisaroiden liikkumista on tapahtunut kuvassa 6.5.

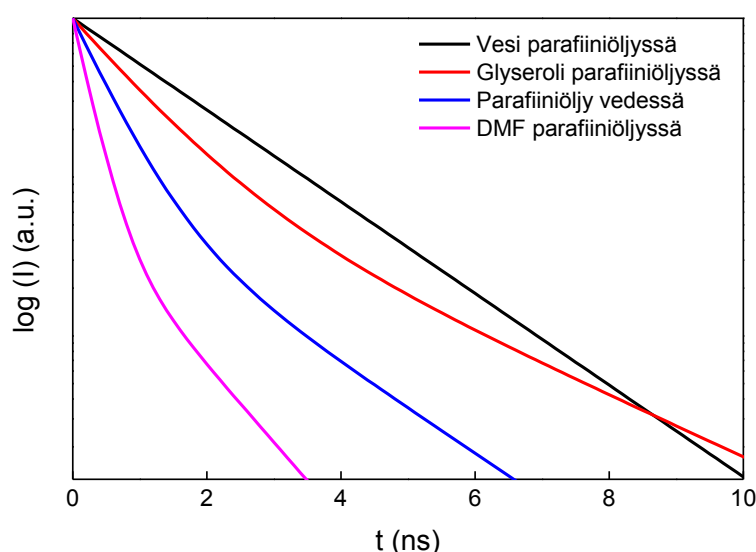


Kuva 6.5. Emulsiopisarat ovat liikkuneet FLIM -kuvissa. (a) DMF parafiiniöljyssä, BODIPY (b) DMF parafiiniöljyssä, DASPMI ja (c) etyleeniglykoli parafiiniöljyssä, DASPMI. FLIM-kuvat on esitetty elinaika-asteikoilla, jotka on esitetty kuvien oikeassa reunassa. FLIM-kuvien koko on (a) $25 \times 25 \mu\text{m}$ ja (b, c) $30 \times 30 \mu\text{m}$.

DMF parafiiniöljyssä -emulsion FLIM-kuvissa emulsiopisaran ja jatkuvan faasin rajapinta ei näytä selkeltä (Kuva 6.5. (a)). Tämä viittaa siihen, että DMF ja parafiiniöljy ovat saattaneet sekoittua osittain keskenään, ja mitattu viskositeetti kuvaa DMF:n ja parafiiniöljyn muodostaman liuoksen viskositeettia. On myös mahdollista että SDS ei ole pysynyt kahden faasin rajapinnalla, vaan on sekoittuneena liuottimiin. DMF parafiiniöljyssä -emulsion mittaustulosten luotettavuuteen vaikuttaa myös alhainen DMF:n viskositeetti. Kuten jo aiemmin kappaleessa 6.1 todettiin, käytetty menetelmä ei kykene erottamaan alhaisia viskositeetteja toisistaan. DMF:n alhaisesta viskositeetistä ja

emulsiopisaroiden liikkumisesta mittauksen aikana johtuen DMF:n mitattu viskositeetti DMF parafiiniöljyssä -emulsiossa on kirjallisuusarvoa suurempi.

DASPMI:n fluoresenssin elinaikoja mitattiin viidessä erilaisessa emulsiossa: vettä parafiiniöljyssä, parafiiniöljyä vedessä, glyserolia parafiiniöljyssä, DMF:a parafiiniöljyssä ja etyleeniglykolia parafiiniöljyssä. Etyleeniglykoli parafiiniöljyssä -emulsion tulokset olivat laadullisesti huonompia kuin muiden emulsioiden, joten se jätettiin pois analyysistä. DASPMI:lla määritetyt vaimenemiskuvaajat olivat suurimmaksi osin kaksiekspotentiaalisia. Kuvassa 6.6. on esitetty emulsioiden yhtälöllä 2.7 lasketut normitetut vaimenemiskuvaajat eri mittausalueilta. Vaimenemiskuvaajista havaitaan vesi parafiiniöljyssä -emulsion emulsiopisaran intensiteetin vaimenemiskuvaajan olevan yksiekspotentiaalinen, ja muiden kaksiekspotentiaalisia.



Kuva 6.6. DASPMI:lla mitattujen emulsioiden lasketut normitetut vaimenemiskuvaajat. Parafiiniöljy vedessä -emulsion vaimenemiskuvaaja määritetty jatkuvasta faasista, ja muille emulsioille emulsiopisaran keskeltä.

Taulukossa 6.4. on esitetty DASPMI:lla mitattujen emulsioiden viskositeetit yksiekspotentiaalisista sovitteista, ja kaksiekspotentiaalisilla sovitteilla määritetyt suhteelliset viskositeetit sekä suhteellisista osuuksista lasketut amplitudipainotteiset viskositeettien keskiarvot.

Vesi parafiiniöljyssä -emulsion FLIM-kuvassa (Kuva 6.7. (a)) emulsiopisaran sisällä on heikko fluoresenssin intensiteetti, minkä perusteella DASPMI on liuenneena enemmän parafiiniöljyyn kuin veteen. Saadut parafiiniöljyn viskositeettia kuvaavat viskositeettien arvot ovat hyvin suuret niin jatkuvassa kuin dispergoituneessakin faasissa. DASPMI:lla saadut puhtaat parafiiniöljyn viskositeetit olivat myös hyvin suuria, mikä aiheutui DASPMI:n epätasaisesta jakautumisesta parafiiniöljyyn. DASPMI jää mahdollisesti kiinni johonkin parafiiniöljyn osaan, mikä aiheuttaa suuret fluoresenssin elinajat, ja edelleen korkeat viskositeettien arvot.

Taulukko 6.4. DASPMI:lla mitattujen emulsioiden yksi- ja kaksiekspotentiaalisista vaimenemiskuvaajien sovituksista määritetyt viskositeetit μ , suhteelliset viskositeetit μ_1 ja μ_2 ja niiden keskimääräiset osuudet (%) sekä amplitudipainotteiset viskositeettien keskiarvot $\langle\mu\rangle$. Lihavuoidut arvot osoittavat, minkä alueen viskositeetin kukin mittaus on määrittänyt, ja sulkeissa olevat arvot eivät vastaa mitatun alueen viskositeettia.

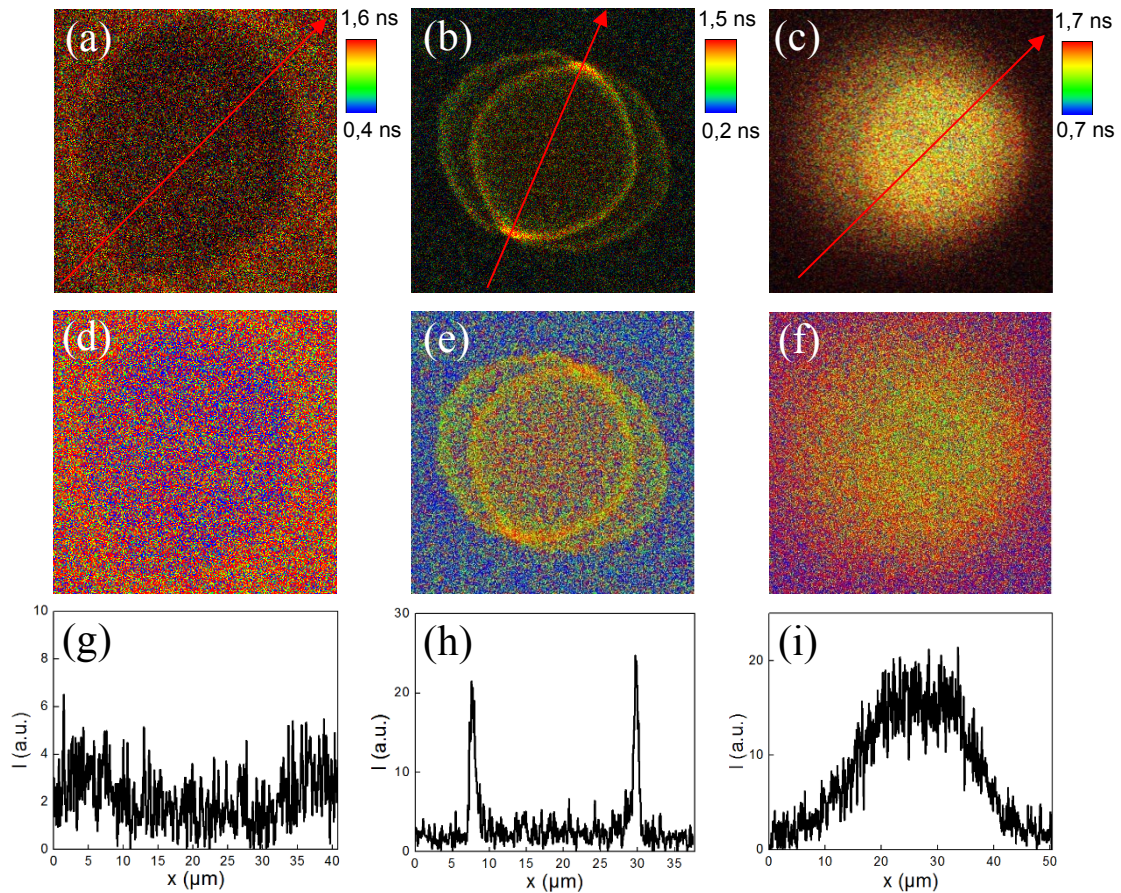
Emulsio	Mitattu alue	μ (mPas)	μ_1 (mPas) [%]	μ_2 (mPas) [%]	$\langle\mu\rangle$ (mPas)
Vesi parafiiniöljyssä	Emulsiopisaran keskikohta*	1508 ± 31	-	-	-
	Emulsiopisaran reuna*	1412 ± 41	-	-	-
	Jatkuva faasi	1307 ± 63	-	-	-
Parafiiniöljy vedessä	Emulsiopisaran keskikohta	-	201 ± 16 [74]	1791 ± 75 [26]	449 ± 28
	Emulsiopisaran reuna	-	256 ± 21 [78]	2052 ± 392 [22]	463 ± 25
	Jatkuva faasi*	-	110 ± 4 [91]	1663 ± 274 [9]	159 ± 8
Glyseroli parafiiniöljyssä	Emulsiopisaran keskikohta	-	409 ± 16 [85]	3744 ± 63 [15]	672 ± 21
	Jatkuva faasi	-	588 ± 140 [58]	3250 ± 337 [42]	1416 ± 61
DMF parafiiniöljyssä	Emulsiopisaran keskikohta*	-	20 ± 1 [94]	504 ± 121 [6]	30 ± 2
	Jatkuva faasi	-	-	-	-

*alhainen liuottimen viskositeetti

Parafiiniöljy vedessä -emulsion FLIM-kuvasta (Kuva 6.7. (b)) havaitaan fluoresenssin intensiteetin olevan suuri emulsiopisaran reunoilla, ja jatkuvassa vesifaasissa todella heikko. DASPMI on jäänyt tässä tapauksessa suurimmaksi osaksi faasien rajapintaan, mistä aiheutuu alhaisempi viskositeetin arvo. Loput DASPMI:sta on taas jäänyt kiinni parafiiniöljyyn, ja parafiiniöljystä aiheutunut viskositeetti on lähellä vesi parafiiniöljyssä -emulsiosta saatuja viskositeetin arvoja.

Glyseroli parafiiniöljyssä -emulsion FLIM-kuvassa (Kuva 6.7. (c)) emulsiopisara on tasaisemman kirkas, ja jatkuvan faasin fluoresenssin intensiteetti on hyvin heikko. DASPMI on tässä tapauksessa liuenneena glyseroliin, ja emulsiopisaran keskeltä saatu lyhyempi elin aika eli pienempi viskositeetti kuvaa glyserolin viskositeettia. Saatu glyserolin viskositeetti vastaa melko hyvin puhtaan glyserolin viskositeettia DASPMI:lla mitattuna (Taulukko 6.2.). Faasien rajapinnalla havaitaan FLIM-kuvan perusteella pidempiä fluoresenssin elin aikoja punaisena värinä. Viskositeetti on siis suurempi faasien rajapinnalla SDS:n ja parafiiniöljyn vaikutuksesta johtuen, mikä havaitaan myös mittaus-tuloksissa.

DMF parafiiniöljyssä -emulsion DASPMI:lla mitatussa FLIM kuvassa (6.5. (b)) emulsiopisarat ovat epäselviä. Emulsiopisarat myös liikkuvat paljon tai muuttavat helposti muotoaan. Emulsiopisaran sisällä on pienempi viskositeetti, joka kuvaa DMF:n viskositeettia. DMF:n viskositeetin arvo jää suureksi sen kirjallisuusarvoon verrattuna, sillä DASPMI:lla ei saada mitattua matalia viskositeetin arvoja. Heikompi ja suurempi viskositeetti kuvaa dispergoituneen ja jatkuvan faasin rajapinnan viskositeettia ja SDS:n vaikutusta rajapinnalla.



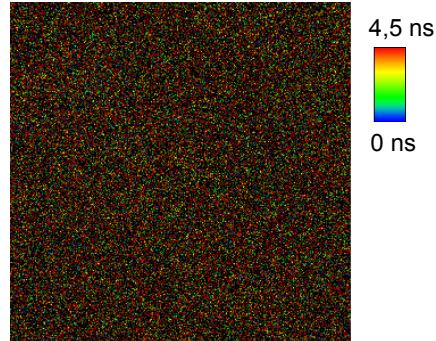
Kuva 6.7. (a) Vesi parafiiniöljyssä, (b) parafiiniöljy vedessä ja (c) glyseroli parafiiniöljyssä -emulsioiden DASPMI:lla mitatut intensiteettimoduloidut FLIM-kuvat, FLIM-kuvat ilman intensiteettiä (d, e, f) sekä FLIM-kuvista määritetty normitettu fluoresenssin intensiteetti FLIM-kuviin merkittyjen nuolten kohdilta (g, h, i). Kuvat on esitetty elinaika-asteikoilla, jotka on esitetty kuvien oikeassa reunassa. FLIM-kuvien koko on (a, d) $30 \times 30 \mu\text{m}$, (b, e) $35 \times 35 \mu\text{m}$ ja (c, f) $40 \times 40 \mu\text{m}$.

Käytetty menetelmä vaikuttaisi soveltuvan kohtuullisen hyvin heterogeenisten näytteiden mikroviskositeettien jakaumien määrittämiseen. Jotta menetelmä toimisi mahdollisimman tarkasti, tulee käytetyn väriaineen liueta tasaisesti tutkittuun liuottimeen. Mikäli väriaine jää kiinni johonkin näytteen osaan, vääristyvät sen fluoresenssin elinaikojen mitatut arvot, ja mitatut viskositeetit saadaan todellista suurempina. Käytetyt väriaineet eivät pysty määrittämään alhaisia viskositeettien arvoja, joten tutkittavien aineiden viskositeettien tulee olla myös riittävät suuria.

6.3 Nanokuituinen selluloosa

0,5 % nanokuituisen selluloosan (NFC) viskositeettia mitattiin käyttämällä väriaineina BODIPY:a ja DASPMI:a. Selluloosakuituja on jakautuneena tasaisesti kaikkialle seokseen, mutta osa kuiduista on valomikroskooppista katsottuna kerääntynyt yhteen, ja muodostaneet suurempia aggregaatteja. Yksittäiset nanoselluloosakuidut ovat ainoastaan na-

nometrien paksuisia, eikä niitä voida havaita valomikroskoopin 100-kertaisella suurennoksella. NFC:n kuitujen muodostamat aggregaatit näkyvät selvästi valomikroskoopissa, mutta BODIPY:lla mitattu FLIM -kuva on hyvin tasainen (Kuva 6.8.). Tämä johtuu BODIPY:n tasaisesta jakautumisesta seokseen.



Kuva 6.8. BODIPY:lla mitattu intensiteettimoduloitu FLIM-kuva NFC:sta. FLIM-kuva on esitetty elinaika-asteikoilla, joka on esitetty kuvan oikeassa reunassa. FLIM-kuvan koko on $30 \times 30 \mu\text{m}$.

BODIPY:lla mitatut intensiteetin vaimenemiskuvaajat NFC:sta määritettiin jokaisessa tapauksessa koko FLIM-kuvasta. Vaimenemiskuvaajat olivat jokaisessa tapauksessa kaksiekspontiaalisia, ja havaittavissa oli selkeästi kaksi eri viskositeettia. Saatujen viskositeettien osuudet olivat noin 50:50. Saadut viskositeetit ja niiden osuudet on esitetty taulukossa 6.5.

Taulukko 6.5. BODIPY:lla määritetyt NFC:n viskositeettien suhteelliset arvot μ_1 ja μ_2 , prosentuaaliset osuudet eri mittauksissa ja tuloksista lasketut keskiarvot.

#	μ_1 (mPas) [%]	μ_2 (mPas) [%]
1	1158 [53]	103 [47]
2	1130 [58]	96 [42]
3	1164 [52]	112 [48]
4	1141 [55]	112 [45]
5	1211 [50]	134 [50]
6	1198 [46]	136 [54]
ka.	1167 ± 13 [52]	116 ± 4 [48]

Taulukossa 6.5. esitetyt suuremmat viskositeettien arvot kuvaavat NFC:n mikroviskositeetin jakaumaa, ja matalammat fluidimman vesifaasin mikroviskositeettia. Mekaanisilla mittausmenetelmillä NFC:n makroviskositeetiksi on saatu NFC:n konsentraatioista riippuen 10–100 000 Pa·s (Bhattacharya et al. 2012), joka on moninkertainen BODIPY:lla mitattuihin mikroviskositeetteihin verrattuna. NFC:n korkeat makroviskositeettien arvot johtuvat todennäköisesti nanokuiduista, jotka vastustavat virtausta mekaanisissa mittausmenetelmissä. NFC:n viskositeetti on myös aivan BODIPY:n kalibraatio-suoran ylärajalla, ja voi mahdollisesti myös ylittää todellisuudessa kalibraatioalueen. BODIPY:a tulisi testata vielä viskoosimmissa liuoksissa tulosten varmistamiseksi. Saadut

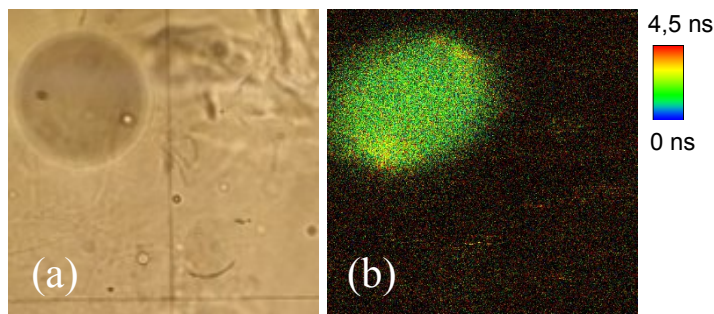
tulokset näyttäisivät viittaavan NFC:n mikroviskositeetin olevan huomattavasti sen makroviskositeettia alhaisempi, mutta tämän varmistamiseksi tarvitaan vielä tarkempia tutkimuksia.

NFC:aan lisättiin vettä parafiiniöljyssä -emulsiota, jotta pystyttiin selvittämään voidaananko emulsiopisaran viskositeetti määrittää myös sen ollessa sekoittuneena NFC:aan, ja vaikuttaako emulsion lisääminen NFC:n viskositeettiin. Taulukossa 6.6. on esitetty määritetyt viskositeetit parafiiniöljystä koostuvan emulsiopisaran kohdalta ja NFC:sta.

Taulukko 6.6. BODIPY:lla määritetyt emulsiopisaran ja NFC:n suhteelliset viskositeetit μ_1 ja μ_2 kaksiekspotentiaalisista soviteista vettä parafiiniöljyssä -emulsion ja NFC:n seoksesta.

Mitattu alue	μ_1 (mPas) [%]	μ_2 (mPas) [%]
Emulsiopisara	90 ± 4 [87]	546 ± 220 [13]
NFC	955 ± 102 [59]	67 ± 15 [41]

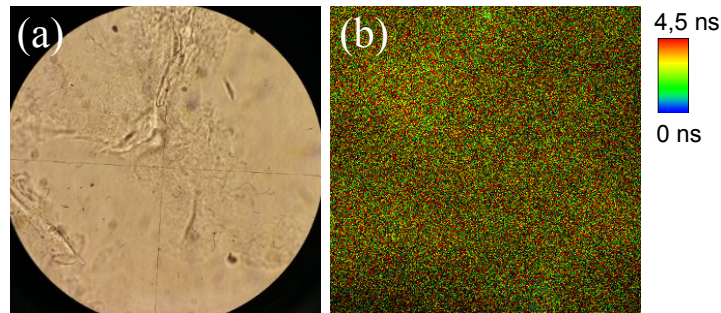
Kuvasta 6.9. (a) ja (b) voidaan selvästi havaita NFC:aan muodostunut emulsiopisara. FLIM-kuvassa (Kuva 6.9. (b)) emulsiopisaran intensiteetti on muuta kuvaa suurempi, eli BODIPY on liuenneena suurimmaksi osaksi emulsiopisaraan. Emulsiopisara koostuu siis täysin parafiiniöljystä, sillä BODIPY on hydrofobinen molekyyli ja liukenee paremmin parafiiniöljyyn kuin vesifaasiin.



Kuva 6.9. Vettä parafiiniöljyssä -emulsiota NFC:ssa (a) ulkoisella kameralla objektiivin läpi otettu kuva valomikroskoopista 100-kertaisella suurennoksella ja (b) BODIPY:lla mitattu intensiteettimoduloitu FLIM-kuva. FLIM-kuva on esitetty elinaika-asteikoilla, joka on esitetty kuvan oikeassa reunassa. FLIM-kuvan koko on $50 \times 50 \mu\text{m}$.

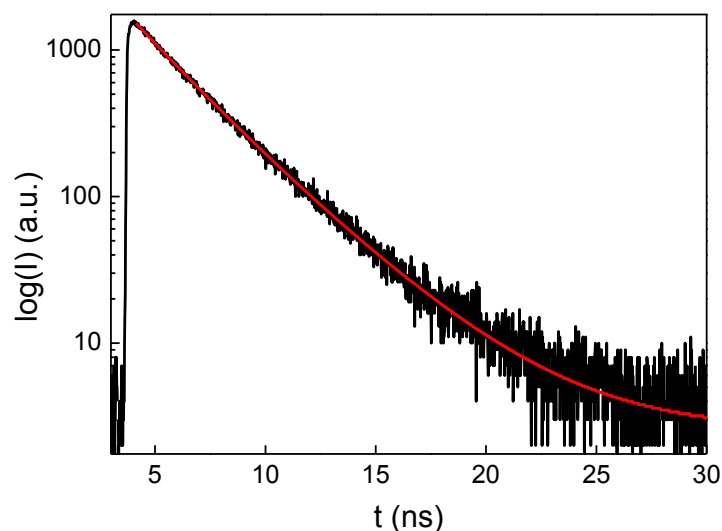
Emulsiopisaran mittauksissa saatu pienempi viskositeetin arvo kuvaa parafiiniöljyn viskositeettia, ja on lähellä arvoa, joka saatiin aiemmissa mittauksissa parafiiniöljyn emulsioita sekä puhdasta parafiiniöljyä tutkittaessa. Suurempi viskositeetti aiheutuu mahdollisesti faasien rajapinnasta, tai muusta vuorovaikutuksesta NFC:n kanssa. NFC:n alueella fluoresenssin intensiteetti on huomattavasti alhaisempi, ja myös lasketut viskositeettien arvot ovat hieman pienempiä verrattuna aiemmin mitattuihin NFC:n viskositeetin arvoihin. Mitä alhaisempi fluoresenssin intensiteetti on, sitä enemmän mittaustulosten luotettavuus vaikuttaisi heikkenevän.

DASPMI:lla mitatut FLIM-kuvat olivat melko tasaisia, mutta kuvista voitiin havaita selkeämmin NFC:n kuitujen muodostamia aggregaatteja korkeaintensiteettisinä alueina (Kuva 6.10.), verrattuna BODIPY:lla mitattuihin FLIM-kuviin. DASPMI:n liukenemista kuituihin seurattiin 20 minuutin ajan väriaineen lisäämisen jälkeen 5 minuutin välein. DASPMI lisättiin suoraan NFC-pisaran päälle ilman sekoitusta. DASPMI oli liuennut NFC-hydrogeeliin 10 minuuttia väriaineen lisäämisen jälkeen.



Kuva 6.10. NFC:a (a) ulkoisella kameralla objektiivin läpi otettu kuva valomikroskoopista 100-kertaisella suurennoksella ja (b) DASPMI:lla mitattu intensiteettimoduloitu FLIM-kuva. FLIM-kuva on otettu läheltä valomikroskoopin kuvan keskikohtaa. FLIM-kuva on esitetty elinaika-asteikoilla, joka on esitetty kuvan oikeassa reunassa. FLIM-kuvan koko on $30 \times 30 \mu\text{m}$.

Vaikka DASPMI:lla mitattu NFC:n FLIM-kuva on melko tasainen, fluoresenssin intensiteetin vaimenemiskuvaaja oli kaksiekspotentiaalinen (Kuva 6.11.). NFC:ssa havaittiin mittaustulosten perusteella selkeästi kaksi eri viskositeettia. DASPMI:lla määritetyt NFC:n viskositeettien arvot olivat hyvin korkeita, mikä aiheutuu DASPMI:n amiiniryhmien ja selluloosakuitujen hydroksyyli-ryhmien välisestä vuorovaikutuksesta. Vuorovaikutus estää DASPMI:n sisäisen rotaation, mistä johtuen fluoresenssin elinajat ja määritetty viskositeetti saavat suuria arvoja.



Kuva 6.11. DASPMI:lla mitattu NFC:n fluoresenssin elinajan vaimenemiskuvaaja ja sen kaksiekspotentiaalinen sovite.

Mittausten perusteella vaikuttaisi siltä, että heterogeenisten systeemien viskositeetteja pystytään määrittämään melko luotettavasti, kunhan väriaine valitaan tutkittavan näytteen ominaisuuksien perusteella. Väriaineen tulee sekoittua tutkittavaan aineeseen mahdollisimman tasaisesti, ja väriainetta tulee olla riittävästi tutkittavassa aineessa, jotta fluoresenssin intensiteetti on tarpeeksi suuri. Lisäksi tutkittavan aineen viskositeetin tulee olla käytetyn väriaineen kalibraatioalueella.

BODIPY vaikuttaisi mittausten perusteella soveltuvan hyvin hydrofobisten aineiden viskositeettien tutkimiseen NFC:ssa, sillä BODIPY liukenee hyvin tutkittavaan öljyfaasiin. Se osa BODIPY:sta joka jää NFC:aan jakautuu tasaisesti, eikä jää kiinni selluloosakuituihin. Tulosten varmistamiseksi tarvitaan kuitenkin vielä tarkempia tutkimuksia. DASP-MI ei puolestaan sovellu mittaustulosten perusteella NFC:ssa olevien aineiden viskositeettien tutkimiseen, sillä DASP-MI jää herkästi kiinni NFC:n selluloosakuitujen hydroksyyliiryhmiin, mikä hidastaa molekyylin sisäisiä rotaatioita ja mitatut fluoresenssin elinajat muuttuvat liian pitkiksi, ja edelleen viskositeetit todellisuutta suuremmiksi.

7. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksessa selvitettiin, soveltuuko elinaikaerotteinen mikroskopia erilaisten heterogeenisten seosten mikroviskositeettien jakauman määrittämiseen. Tutkimuksessa käytettiin väriaineina BODIPY:a ja DASPMI:a, joille oltiin aiemmin määritetty kalibraatiosuorat viskositeetin ja fluoresenssin elinajan suhteen. Menetelmää testattiin aluksi määrittämällä homogeenisten puhtaiden liuottimien mikroviskositeetteja kummallakin väriaineella. Tämän jälkeen siirryttiin määrittämään heterogeenisten systeemien mikroviskositeettien jakaumaa. Heterogeeniset näytteet olivat erilaisia emulsioita, nanokuituista selluloosaa (NFC), sekä näiden seoksia. Taulukossa 7.1. on kuvattu BODIPY:n ja DASPMI:n soveltuvuutta erilaisten emulsioiden ja NFC:n viskositeetin määrittämiseen.

Taulukko 7.1. Eri väriaineiden soveltuvuus emulsioiden eri faasien ja NFC:n viskositeetin määrittämiseen.

Emulsio	BODIPY	DASPMI
Vesi parafiiniöljyssä	J	J
Parafiiniöljy vedessä	D	D
Glyseroli parafiiniöljyssä	J	D
Parafiiniöljy glyserolissa	D	ei mitattu
DMF parafiiniöljyssä	faasit sekoittuivat	D
Etyleeniglykoli parafiiniöljyssä	J	ei mitattu
NFC	+	–

J = jatkuva faasi, D = dispergoitunut faasi, + toimii hyvin, – ei toimi

BODIPY:lla pystyttiin määrittämään erilaisten puhtaiden liuottimien viskositeetteja melko tarkasti BODIPY:n kalibraatioalueella riippumatta liuottimen poolisuudesta. BODIPY on hydrofobinen molekyyli, mistä johtuen heterogeenisissä systeemeissä BODIPY hakeutuu suurimmaksi osaksi systeemin poolittomaan alueeseen, eikä vesiliukoisten alueiden viskositeettia saada määritettyä lainkaan. Parafiiniöljyä sisältävien emulsioiden viskositeettimittauksissa BODIPY hakeutui suurimmaksi osaksi parafiiniöljystä koostuville alueille ja ilmaisi ainoastaan parafiiniöljyn viskositeetin. BODIPY:lla määritetyt parafiiniöljyn viskositeettien arvot olivat jokaisessa systeemissä hyvin lähellä toisiaan. Tästä voidaankin päätellä BODIPY:n soveltuvan heterogeenisissä systeemeissä hyvin määrittämään viskositeetteja poolittomilta alueilta, joihin BODIPY liukenee tasaisesti. Lisäksi tutkittavan aineen viskositeetin on oltava BODIPY:n kalibraatioalueen sisällä.

BODIPY:lla määritettiin lisäksi 0,5 % NFC:n mikroviskositeetin jakaumaa. NFC:lle saatiin mittauksissa kaksi viskositeetin arvoa. Suurempi, noin 1000 mPas suuruinen viskositeetti kuvaa todennäköisesti NFC:n kuitujen viskositeettia ja matalampi noin 100 mPas kuitujen ympärillä olevan veden viskositeettia. NFC:n makroviskositeetin arvoksi on saatu aikaisemmissa tutkimuksissa huomattavasti suurempia arvoja (10–100 000 Pa·s,) riippuen NFC:n konsentraatiosta (Bhattacharya et al. 2012). Aikaisemmissa tutkimuksissa NFC:n makroviskositeettia on määritetty mekaanisilla mittausten menetelmillä, joissa selluloosakuidut saattavat vastustaa virtauksen liikettä ja vääristää tuloksia todellisuutta suuremmiksi.

BODIPY:lla pyrittiin määrittämään lisäksi NFC:ssa olevien parafiiniöljyn emulsiopisaroiden viskositeettia. Parafiiniöljyn viskositeetti vastasi hyvin emulsioiden ja puhtaan parafiiniöljyn viskositeetin mitattuja arvoja. NFC:n viskositeetti oli hieman alhaisempi, kuin pelkän NFC:n viskositeetin mittauksen tapauksessa. Saatujen tulosten perusteella käytetyllä menetelmällä on mahdollista määrittää NFC:ssa olevien aineiden mikroviskositeettia, kunhan väriaine soveltuu NFC:n viskositeetin mittaamiseen, ja liukenee tasaisesti tutkittavaan aineeseen.

DASPMI:lla määritettiin homogeenisistä näytteistä ainoastaan puhtaan glyserolin viskositeetti. DASPMI ei soveltunut parafiiniöljyn viskositeetin määrittämiseen, sillä DASPMI ei sekoittunut tasaisesti parafiiniöljyyn. DASPMI:n kalibraatioalue oli lisäksi BODIPY:n kalibraatioaluetta suppeampi, ja muiden puhtaiden liuottimien viskositeetit olivat selvästi DASPMI:n kalibraatioalueen alapuolella. Parafiiniöljyn emulsioissa DASPMI:lla määritetyt parafiiniöljyn viskositeetit olivat todellisuutta suurempia, kuten myös puhtaan parafiiniöljyn mittauksissa havaittiin. Glyseroli parafiiniöljyssä -emulsion tapauksessa glyserolin viskositeetti saatiin määritettyä melko lähelle puhtaan glyserolin määritettyä viskositeetin arvoa. DASPMI ei soveltunut parafiiniöljyn emulsioiden viskositeettien määrittämiseen muissa tapauksissa, johtuen sen huonosta sekoittuvuudesta parafiiniöljyyn.

DASPMI ei soveltunut lainkaan NFC:n viskositeetin määrittämiseen. DASPMI:n amiiniryhmien ja selluloosamolekyylien hydroksyyli ryhmien välillä on vuorovaikutus, joka estää DASPMI:n roottoriosan vapaan pyörimisen. Tästä johtuen DASPMI:n fluoresenssin elin aika pitenee, ja viskositeetit saadaan todellisuutta suurempina.

Tutkimuksissa havaittiin, että tutkittavan näytteen ominaisuudet vaikuttavat suuresti sopivan väriaineen valintaan. Tutkittavan näytteen viskositeetin tulee olla väriaineen kalibraatioalueella, eli BODIPY:n tapauksessa 20–1330 mPas ja DASPMI:lle 60–1330 mPas. Matalilla viskositeettien arvoilla viskositeetti ei riipu enää lineaarisesti fluoresenssin elin ajasta. Lisäksi väriaineen tulee sekoittua tasaisesti tutkittavaan aineeseen. Väriaineen konsentraation tulee myös olla riittävän suuri tutkittavalla alueella, jotta fluoresenssin intensiteetti on tarpeeksi korkea. Intensiteetin ollessa korkea, jää taustan aiheuttama virhe fluoresenssin elin ajan vaimenemiskuvaaajissa mahdollisimman vähäiseksi.

Käytetyllä menetelmällä voidaan siis saatujen tulosten perusteella määrittää melko luotettavasti erilaisten heterogeenisten systeemien mikroviskositeettien jakaumaa, kunhan väriaineille annetut ehdot täyttyvät. Jatkossa menetelmää voidaan soveltaa mikroviskositeetin tutkimiseen monimutkaisemmissa heterogeenissä systeemeissä, kuten esimerkiksi solujen eri osien mikroviskositeettien jakaumien tutkimiseen.

LÄHTEET

- Athanasiadis, A., Fitzgerald, C., Davidson, N., Giorio, C., Botchway, S., Ward, A., Kalberer, M., Pope, F. & Kuimova, M. (2016). Dynamic viscosity mapping of the oxidation of squalene aerosol particles, *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 18, no. 44, pp. 30385-30393.
- Basuki, J., Duong, H., Macmillan, A., Erlich, R., Esser, L., Akerfeldt, M., Whan, R., Kavallaris, M., Boyer, C. & Davis, T. (2013). Using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy to Monitor Theranostic Nanoparticle Uptake and Intracellular Doxorubicin Release, *Acs Nano*, vol. 7, no. 11, pp. 10175-10189.
- Battisti, A., Panettieri, S., Abbandonato, G., Jacchetti, E., Cardarelli, F., Signore, G., Beltram, F. & Bizzarri, R. (2013). Imaging intracellular viscosity by a new molecular rotor suitable for phasor analysis of fluorescence lifetime, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 405, no. 19, pp. 6223-6233.
- Becher, P. (1965). *Emulsions: theory and practice*, Reinhold, New York, 2nd edition 440 p.
- Bhattacharya, M., Malinen, M.M., Lauren, P., Lou, Y., Kuisma, S.W., Kanninen, L., Lille, M., Corlu, A., GuGuen-Guillouzo, C., Ikkala, O., Laukkanen, A., Urtti, A. & Yliperttula, M. (2012). Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture, *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, vol. 164, no. 3, pp. 291-8.
- Borst, J.W., Visser, A. (2010). Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences, *Measurement Science and Technology*, vol. 21, no. 10, 21 pp.
- Chen, A.K., Cheng, Z., Behlke, M.A. & Tsourkas, A. (2008). Assessing the sensitivity of commercially available fluorophores to the intracellular environment, *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 19, pp. 7437-7444.
- Dent, M., Lopez-Duarte, I., Dickson, C., Geoghegan, N., Cooper, J., Gould, I., Krams, R., Bull, J., Brooks, N. & Kuimova, M. (2015). Imaging phase separation in model lipid membranes through the use of BODIPY based molecular rotors, *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 17, no. 28, pp. 18393-18402.
- Dufresne, A. (2012). *Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials*, De Gruyter, Berlin/Boston. 460 p.
- Farah, M.A., Oliveira, R.C., Caldas, J.N. & Rajagopal, K. (2005). Viscosity of water-in-oil emulsions: Variation with temperature and water volume fraction, *Journal of Petroleum Science and Engineering*, vol. 48, no. 3, pp. 169-184.

Fitzgerald, C., Hosny, N.A., Tong, H., Seville, P.C., Gallimore, P.J., Davidson, N.M., Athanasiadis, A., Botchway, S.W., Ward, A.D., Kalberer, M., Kuimova, M.K. & Pope, F.D. (2016), Fluorescence lifetime imaging of optically levitated aerosol: a technique to quantitatively map the viscosity of suspended aerosol particles, *Physical chemistry chemical physics*, vol. 18, no. 31, pp. 21710-21719.

Graebel, W.P. (2001). *Engineering fluid mechanics*, Taylor & Francis, New York. 676 p.

Gupta, N., Reja, S., Bhalla, V., Gupta, M., Kaur, G. & Kumar, M. (2016). A bodipy based fluorescent probe for evaluating and identifying cancer, normal and apoptotic C6 cells on the basis of changes in intracellular viscosity, *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 4, no. 11, pp. 1968-1977.

Habibi, Y., Lucia, L.A. & Rojas, O.J. (2010). Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications, *Chemical Reviews*, vol. 110, no. 6, pp. 3479-3500.

Hosny, N.A., Mohamedi, G., Rademeyer, P., Owen, J., Wu, Y., Tang, M., Eckersley, R.J., Stride, E. & Kuimova, M.K. (2013). Mapping microbubble viscosity using fluorescence lifetime imaging of molecular rotors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 23, pp. 9225-9230.

Hosny, N., Fitzgerald, C., Vysniauskas, A., Athanasiadis, A., Berkemeier, T., Uygur, N., Poschl, U., Shiraiwa, M., Kalberer, M., Pope, F. & Kuimova, M. (2016). Direct imaging of changes in aerosol particle viscosity upon hydration and chemical aging, *Chemical Science*, vol. 7, no. 2, pp. 1357-1367.

Hungerford, G., Allison, A., McLoskey, D., Kuimova, M.K., Yahiloglu, G. & Suhling, K. (2009). Monitoring sol-to-gel transitions via fluorescence lifetime determination using viscosity sensitive fluorescent probes, *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, no. 35, pp. 12067-12074.

Kalia, S., Boufi, S., Celli, A. & Kango, S. (2013). Nanofibrillated cellulose: surface modification and potential applications, *Colloid and Polymer Science*, vol. 292, no. 1, pp. 5-31.

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. & Bohn, A. 2005, Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material, *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 44, no. 22, pp. 3358-3393.

Kuimova, M.K., Yahiloglu, G., Levitt, J.A. & Suhling, K. (2008). Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, no. 21, pp. 6672-6673.

Kuimova, M.K. (2012). Mapping viscosity in cells using molecular rotors, *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 14, no. 37, pp. 12671-12686.

Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer. 3rd edition 954 p.

Levitt, J.A., Kuimova, M.K., Yahiloglu, G., Chung, P., Suhling, K. & Phillips, D. (2009). Membrane-bound molecular rotors measure viscosity in live cells via fluorescence lifetime imaging, *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, no. 27, pp. 11634-11642.

Lichtman, J.W., Conchello J.-A. (2005). Fluorescence microscopy, *Nature methods*, Vol. 2, No. 12, pp. 910-919.

Lide, D.R. Internet Version (2009). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 89th Edition, CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL.

Loison, P., Hosny, N.A., Gervais, P., Champion, D., Kuimova, M.K. & Perrier-Cornet, J. (2013). Direct investigation of viscosity of an atypical inner membrane of *Bacillus* spores: A molecular rotor/FLIM study, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1828, no. 11, pp. 2436-2443.

Lubeck, E. & Cai, L. (2012). Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling, *Nature Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 743-748.

McClements, J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2nd edition 609 p.

Medronho, B., Romano, A., Miguel, M.G., Stigsson, L., Lindman, B. (2012). Rationalizing cellulose (in)solubility: reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions, *Cellulose*, vol. 19, no. 3, pp. 581-587.

Merck. (2016). Safety Data Sheet, Paraffin highly liquid. CAS-No. 8042-47-5. Version 3.3 14 p.

Mohanty, M.E. & Mishra, A.K. (2013). Estimating viscosity and polarity in the microenvironment of polymeric gels—introducing a microviscosity parameter, *Journal of Polymer Research*, vol. 20, no. 7, pp. 1-8.

Muramoto, S., Tezuka, F. & Agata, W. (2000), Effects of Anionic Surface Active Agents on the Uptake of Aluminum by *Cyperus alternifolius* L. Exposed to Water Containing High Levels of Aluminum, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 64, no. 1, pp. 122-129.

Naderi, A. (2017). Nanofibrillated cellulose: properties reinvestigated, *Cellulose*, vol. 24, no 5, pp. 1933-1945.

Paronen, P. (2016). Vesikkeli - elävä solu –systemien tutkiminen fluoresenssinelinaikamikroskopiolla. Diplomityö. Tampereen teknillinen yliopisto, kemian ja biotekniikan laitos. 63 p. Saatavissa: <http://URN.fi/URN:NBN:fi:tty-201602293582>

de la Peña, A., Mujumdar, N., Heider, E., Goicoechea, H., de la Peña, D. & Campiglia, A. (2016). Nondestructive Total Excitation-Emission Fluorescence Microscopy Combined with Multi-Way Chemometric Analysis for Visually Indistinguishable Single Fiber Discrimination, *Analytical Chemistry*, vol. 88, no. 5, pp. 2967-2975.

Peng, X., Yang, Z., Wang, J., Fan, J., He, Y., Song, F., Wang, B., Sun, S., Qu, J., Qi, J. & Yan, M. (2011). Fluorescence ratiometry and fluorescence lifetime imaging: Using a single molecular sensor for dual mode imaging of cellular viscosity, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 17, pp. 6626-6635.

Phan-Thien, N. & Pham, D.C. (1997). Differential multiphase models for polydispersed suspensions and particulate solids, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, vol. 72, no. 2, pp. 305-318.

PicoQuant (2005). MicroTime 200 Time-resolved Confocal Fluorescence Microscope, PicoQuant, GmbH.

Pääkko, M., Ankerfors, M., Kosonen, H., Nykänen, A., Ahola, S., Österberg, M., Ruokolainen, J., Laine, J., Larsson, P.T., Ikkala, O., Lindström, T. (2007). Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels, *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 6, pp. 1934-1941.

Rei, A., Hungerford, G. & Ferreira, M.I.C. (2008). Probing local effects in silica sol-gel media by fluorescence spectroscopy of p-DASPMI, *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 29, pp. 8832-8839.

Sabnis, R.W. (2010). *Handbook of Biological Dyes and Stains Synthesis and Industrial Applications*, 1st edn, John Wiley & Sons Inc, US. 522 p.

Schramm, L.L. (2014). *Emulsions, Foams, Suspensions, and Aerosols: Microscience and Applications*, 2nd edition, Wiley-VCH, DE.

Shimolina, L., Izquierdo, M., Lopez-Duarte, I., Bull, J., Shirmanova, M., Klapshina, L., Zagaynova, E. & Kuimova, M. (2017). Imaging tumor microscopic viscosity in vivo using molecular rotors, *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 41097.

Siró, I. & Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review, *Cellulose*, vol. 17, no. 3, pp. 459-494.

Song, X., Li, N., Wang, C. & Xiao, Y. (2017). Targetable and fixable rotor for quantifying mitochondrial viscosity of living cells by fluorescence lifetime imaging, *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, no. 2, pp. 360-368.

Suhling, K., Hirvonen, L.M., Levitt, J.A., Chung, P., Tregidgo, C., Le Marois, A., Ruskov, D.A., Zheng, K., Ameer-Beg, S., Poland, S., Coelho, S., Henderson, R. & Krstajic, N. (2015). Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments, *Medical Photonics*, vol. 27 pp. 3-40.

Taylor, G.I. (1932). The Viscosity of a Fluid Containing Small Drops of Another Fluid, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, vol. 138, no. 834, pp. 41-48.

Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, 1st edition 381 p.

Vyšniauskas, A., Qurashi, M. & Kuimova, M.K. (2016). A Molecular Rotor that Measures Dynamic Changes of Lipid Bilayer Viscosity Caused by Oxidative Stress, *Chemistry – A European Journal*, vol. 22, no. 37, pp. 13210-13217.

Wardle, B. (2009). *Principles and Applications of Photochemistry*, 1st edition, John Wiley & Sons Inc, US. 266 p.

Wu, Y., Stefl, M., Olzynska, A., Hof, M., Yahioğlu, G., Yip, P., Casey, D., Ces, O., Humpolickova, J. & Kuimova, M. (2013). Molecular rheometry: direct determination of viscosity in L-o and L-d lipid phases via fluorescence lifetime imaging, *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 36, pp. 14986-14993.

Xu, H., Liu, J., Li, Y., Yin, Y., Zhu, C. & Lu, H. (2014). Autofocus using adaptive prediction approximation combined search for the fluorescence microscope in second-generation DNA sequencing system, *Applied Optics*, vol. 53, no. 20, pp. 4509-4518.